

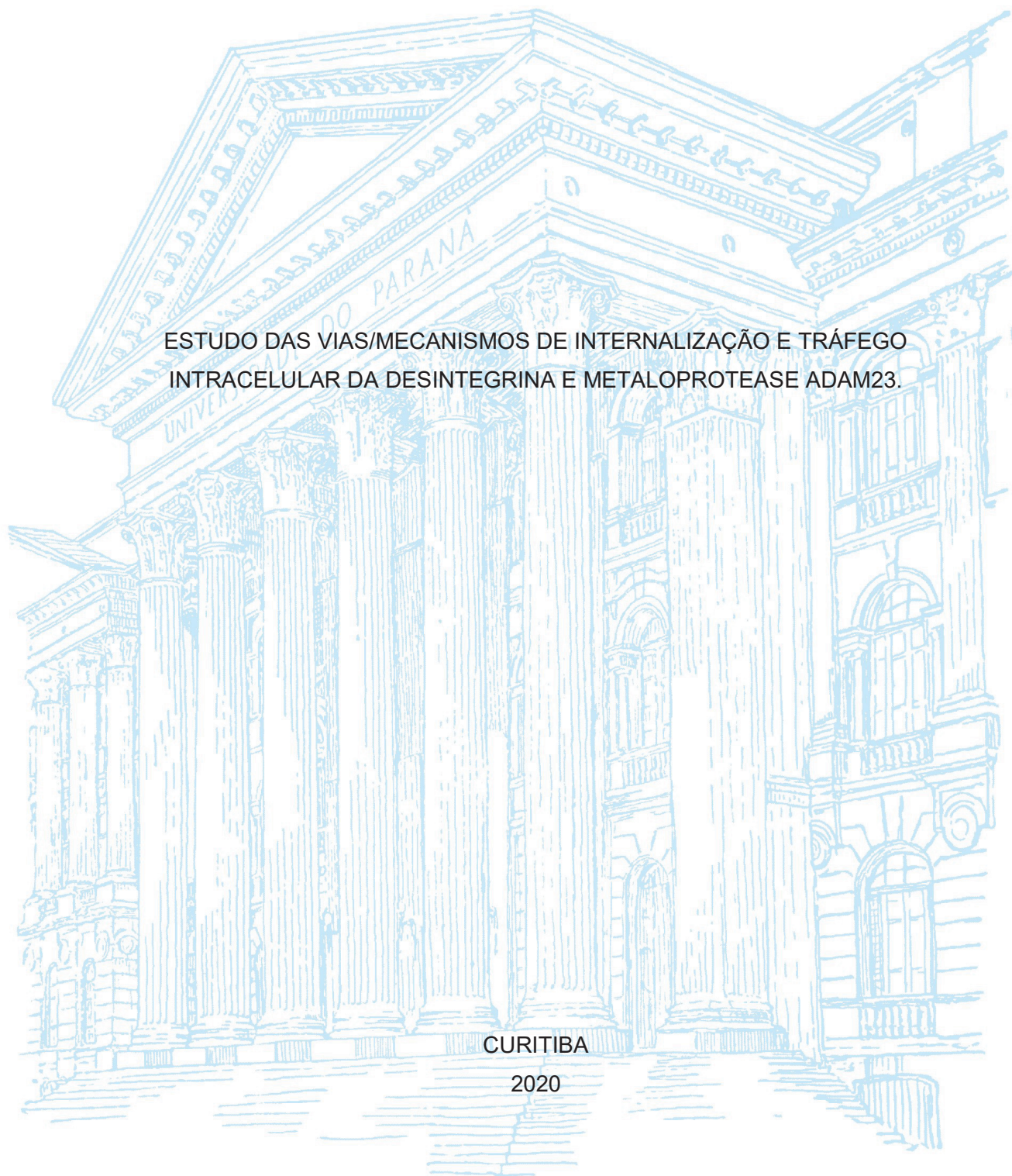
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

INGRID LARISSA MELO DE SOUZA

ESTUDO DAS VIAS/MECANISMOS DE INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO
INTRACELULAR DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23.

CURITIBA

2020



INGRID LARISSA MELO DE SOUZA

ESTUDO DAS VIAS/MECANISMOS DE INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO
INTRACELULAR DA DESINTEGRINA E METALOPROTEASE ADAM23.

Tese de Doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Marques Zanata

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Souza, Ingrid Larissa Melo de
Estudo das vias/mecanismos de internalização e tráfego intracelular da
desintegrina e metaloprotease ADAM23. / Ingrid Larissa Melo de Souza. –
Curitiba, 2020.
124 p.: il.

Orientador: Silvio Marques Zanata

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Proteínas ADAM 2. Metaloproteases 3. Endocitose I. Título II.
Zanata, Silvio Marques, 1974- III. Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

CDD (22. ed.) 572.6



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8


TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **INGRID LARISSA MELO DE SOUZA** intitulada: **Estudo das vias/mecanismos de internalização e tráfego intracelular da desintegrina e metaloprotease ADAM23**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Março de 2020.


FRANCISCO FILIPAK NETO
Presidente da Banca Examinadora


CARLOS ALEXANDRE DOS SANTOS HAEMMERLE
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)


PRISCILLA FANINI WOWK
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)


MARCEL IVAN RAMÍREZ ARAYA
Avaliador Interno (IOC - FIOCRUZ)

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Euclides (*in memorian*) e à minha mãe Marluce por todo amor incondicional, incentivo e exemplo de vida.

E ao meu colega de doutorado Ricardo (*in memorian*)
que dedicou sua vida tão jovem à pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças para lutar e por tantas oportunidades e alegrias.

Aos meus pais, Euclides (*in memorian*) e Marluce, por todo apoio, amor e orientação durante toda a minha vida. Muito obrigada não apenas pelo apoio financeiro, mas, principalmente pelo apoio emocional. Não sei como agradecer todo o apoio e a dedicação de vocês para a minha formação. Obrigada por todo incentivo e exemplo de vida.

Ao meu namorado Diego, por todo o amor, compreensão e pela ajuda. Obrigada por ir comigo ao laboratório aos finais de semana, noites, feriados e sempre que necessário. Obrigada também por compartilhar comigo momentos de tristeza e alegria.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Marques Zanata, pela oportunidade a mim concedida para realizar o mestrado sob sua orientação no Laboratório de Neurobiologia, e, principalmente, pelos ensinamentos científicos que me passou. Obrigada pela orientação, pela ajuda com os experimentos, pela disponibilização de materiais e reagentes, pela boa convivência em laboratório e por me ensinar a sempre ter paciência. Certamente, todo o aprendizado que obtive neste período contribuiu para a minha formação acadêmica e profissional.

Às Professoras Dra. Lia Nakao e Dra. Adriana Frohlich pela ajuda com dúvidas e disponibilização do Laboratório de Neurobiologia, materiais e reagentes.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurobiologia, Silvia, Natália, Pierina, Sze, Soraia, Evellyn, Karime, Larissa, Jordana, Giovanna, Pedro e Ricardo (*in memorian*) por toda a amizade, ensinamentos e ajuda, em tantos momentos. Obrigada por alegrarem o ambiente de trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Neurobiologia, tanto os integrantes atuais como os que passaram por lá durante o período de realização deste trabalho.

Ao meu querido irmão Antônio, minha gratidão por todo apoio, carinho e inspiração.

À minha amiga Nancy Watanabe pelo incentivo, inspiração, apoio, carinho e pela amizade sincera ao longo de anos! Obrigada por compartilhar comigo momentos de alegria e tristeza!

A todos os meus outros amigos da UFSC, o químico Leandro e à Lindsey Scarelli por todo apoio, ensinamento, inspiração e por me incentivarem a não desistir. Obrigada também por compartilharem comigo momentos de tristeza e alegria.

Aos técnicos do CTAF (Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência) por todo o auxílio com obtenção das imagens no microscópio confocal.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e Fundação Araucária pela bolsa e financiamento deste projeto.

Meus agradecimentos a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o desenvolvimento da minha formação durante este período.

RESUMO

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) é uma família de proteínas transmembranas envolvidas em funções biológicas tais como: liberação de fatores de crescimento e citocinas, desenvolvimento da musculatura e fertilização. No sistema nervoso as ADAMs parecem ter papéis importantes no desenvolvimento, regulando proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de vários tipos celulares, bem como a regulação do crescimento axonal e mielinização. Para estudar a internalização de ADAM23, foi utilizado um ensaio de biotilação de proteínas de superfície celular de neuroblastomas transientemente transfectados com ADAM23. Foi observado que ADAM23 foi constitutivamente internalizada e esteve relativamente estável em quantidade na membrana plasmática por 72h após o início da internalização.

Após o início da internalização, ADAM23 co-localizou com ambos endossomos precoce e de reciclagem, parecendo ser rapidamente transportada de volta para a membrana pela via do Rab4 ou mais lentamente pela via do Rab11. A partir do ensaio com a marcação com anti-ADAM23, a ADAM23 pareceu ser rapidamente (menos de 1 h) e continuamente reciclada, considerando a rápida reciclagem vista através de Rab4. A reciclagem de ADAM23 através de ambos os endossomos de reciclagem rápida (Rab4) e lenta (Rab11) pode ter a ver com duração e estabilidade da quantidade de proteína ADAM23 na superfície celular. Além disso, foi vista co-localização da ADAM23 com endossomo precoce (EEA1) e com endossomo intermediário (Rab5). Foi observada também co-localização da ADAM23 com fagossomo Rab7 o pré-cursor da via lisossomal.

Considerando o papel da ADAM23 no câncer e em doenças neurológicas como epilepsia, o potencial da sua atividade na membrana plasmática, especialmente interagindo com integrinas, LGIs e PrPc, sua localização na superfície celular, sua internalização e reciclagem provavelmente são mecanismos bem controlados. A regulação da expressão de ADAM23 na membrana, o processo de endocitose e a reciclagem da ADAM23 podem estar relacionados à severidade dessas condições clínicas e ser potenciais alvos terapêuticos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a descrição da via de internalização da ADAM23 e seu tráfego intracelular.

Palavras-chave: ADAM23. Desintegrina metaloprotease. Endocitose. Internalização. Endossomo. Reciclagem. Degradação. Estabilidade.

ABSTRACT

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) is a family of transmembrane proteins involved in a variety of biological functions such as: growth factors and cytokines secretion, muscular tissue development and fertilization. In nervous system, many ADAMs seem to have important roles during development, regulating proliferation, migration, differentiation and survival of various cell types, in addition to axonal growth and myelination regulation. In order to study ADAM23 internalization, it was performed a biotinylation assay of plasma membrane proteins in transiently ADAM23 transfected neuroblastomas. It was observed that ADAM23 was constitutively internalized and that this protein quantity was relatively stable in plasma membrane 72h after the beginning of internalization.

After the initiation of internalization, ADAM23 co-localized with both early and recycling endosomes, suggesting that ADAM23 might be quickly transported back to plasma membrana through Rab4 endosome or more slowly through endosome Rab11 pathway. Through anti-ADAM23 labeling assay, ADAM23 seemed to be rapidly (less than 1 hour) and continuously recycled, considering its co-localization with Rab4. ADAM23 recycling through rapid (Rab4) and slow (Rab11) recycling pathways might be related to ADAM23 duration and stability at cell surface. In addition, it was observed ADAM23 colocalization with early endosome (EEA1) and with intermediate endosome (Rab5). Interestingly, it was also seen ADAM23 colocalization with Rab7 phagosome, the lysosomal pathway precursor.

Regarding ADAM23 role in cancer and in neurological diseases such as epilepsy, its potential of activity in plasma membrane, specially interacting with integrins, LGIs and PrPc, its location at cell surface, its internalization and recycling are probably well-controlled mechanisms. The regulation of ADAM23 expression at plasma membrane, the endocytosis process and recycling of ADAM23 might be related to clinical severity and be potential therapeutic targets. In this matter, the present work had as an objective the description of the internalization pathway and intracellular traffic of ADAM23.

Keywords: ADAM23. Disintegrin Metalloprotease. Endocytosis. Internalization. Endosome. Recycling. Degradation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA DE ADAM.	19
FIGURA 2 – ESQUEMA DA ATIVAÇÃO DA ATIVAÇÃO PRÓ-ENZIMÁTICA DA ADAM PELA REMOÇÃO DO PRÓ-DOMÍNIO.	28
FIGURA 3 – ESTRUTURA DE PRP.	31
FIGURA 4 – VIAS DE ENDOCITOSE E RECICLAGEM ENDOCÍTICA.....	38
FIGURA 5 – VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DE PRPC.	39
FIGURA 6 – TRÁFEGO DE INTEGRINAS.	43
FIGURA 7 – PAPEL DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO NO TRÁFEGO DE INTEGRINAS.....	44
FIGURA 8 – MECANISMO PROPOSTO PARA A INTERNALIZAÇÃO CONSTITUTIVA E RECICLAGEM DA ADAM12.....	47
FIGURA 9 – ESQUEMA DA CROMATOGRRAFIA DE AFINIDADE À CONCAVALINA A- SEPHAROSE OU ENRIQUECIMENTO EM GLICOPROTEÍNAS.	51
FIGURA 10 – MAPA DO VETOR PCMV6-ENTRY E O SÍTIO DE POLICLONAGEM USADO COM OS INSERTOS ADAM23V1 E ADAM23V2.....	54
FIGURA 11 – ESQUEMA DO ENSAIO DE BIOTINILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	56
FIGURA 12 – ETAPAS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRRAFIA DE AFINIDADE À RESINA DE NÍQUEL-AGAROSE (NI-NTA).	59
FIGURA 13 – ESQUEMA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA I.	64
FIGURA 14 – ESQUEMA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA II.	66
FIGURA 15 – ESQUEMA DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	70
FIGURA 16 – FORMAS DA ADAM23 EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA 435, 435-1C E NEURONAL SHSY-5Y.....	72
FIGURA 17 – PURIFICAÇÃO DA ADAM23 RECOMBINANTE (DIS-CYS).....	73

FIGURA 18 – RESULTADO DA PURIFICAÇÃO DO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À RESINA CNBR-ADAM23(DIS-CYS)..	74
FIGURA 19 – ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA ADAM23 POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE CONJUGADA AO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 PURIFICADO.....	76
FIGURA 20 – ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DAS FORMAS DE ADAM23 POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE CONJUGADA AO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 PURIFICADO.	77
FIGURA 21 – AS VARIANTES 1 E 2 DE ADAM23 POSSUEM DIVERGÊNCIAS NA CAUDA CITOPLASMÁTICA.	78
FIGURA 22 – EFICIÊNCIA DO TCEP SOBRE O GSH NA REDUÇÃO/STRIPPING DA BIOTINA RESIDUAL LIGADA ÀS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR NOS ENSAIOS DE CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO.....	79
FIGURA 23 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS MURINOS N2A.	81
FIGURA 24 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS MURINO N2A.....	82
FIGURA 25 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS HUMANO SHSY-5Y.....	83
FIGURA 26 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS HEK-293T.	85
FIGURA 27 – TESTE DE LIGAÇÃO DO ANTI-ADAM23 NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS N2A.....	86
FIGURA 28 – ADAM23 É INTERNALIZADA EM 15 MIN. EM CÉLULAS N2A.	87
FIGURA 29 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS PRECOCES (<i>EARLY ENDOSOMES</i>).	89
FIGURA 30 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS INTERMEDIÁRIOS (RAB5-POSITIVOS).	90

FIGURA 31 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS DE RECICLAGEM RÁPIDA (RAB4-POSITIVOS).....	91
FIGURA 32 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS DE RECICLAGEM LENTA (RAB11-POSITIVOS).....	93
FIGURA 33 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM FAGOSSOMOS RAB7-POSITIVOS.	94
FIGURA 34 – INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO INTRACELULAR DE ADAM23.	95
FIGURA 35 – TRATAMENTO COM 2,5 μ M DE MBCD NÃO INIBIU A ENDOCITOSE DE ADAM23.	97
FIGURA 36 – A QUANTIDADE DE ADAM23 EM N2A É ESTÁVEL MESMO APÓS BLOQUEIO DA SÍNTESE PROTÉICA COM 10 μ M DE CYCLOHEXIMIDE.	98
FIGURA 37 – ADAM23 PRESENTE NA MEMBRANA PLASMÁTICA TEM LONGA ESTABILIDADE PROTÉICA.	99
FIGURA 38 – O ANTICORPO ANTI-ADAM23 (DL11C8) TEM ESPECIFICIDADE PARA ADAM23 EM LINHAGEM NEURO-2A E 293T.	101
FIGURA 39 – CÉLULAS N2A TRATADAS COM INIBIDOR DE FURINA NÃO APRESENTAM OU APRESENTAM EM QUANTIDADE REDUZIDA A FORMA DA ADAM23 DE 70 KDA.	103

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

aa – aminoácidos

α -ADAM23 – Anticorpo anti-ADAM23

α -IgG – Anticorpo anti-IgG

$\alpha\beta 3$ – Integrina de subunidade αv e subunidade $\beta 3$

ADAM – Desintegrina e metaloproteinase, do inglês, *A disintegrin and metalloproteinase*

ADAM23V1 – Variante 1 da ADAM23 murina do vetor pCMV6 da Origene (apenas forma de 100 kDa)

ADAM23V2 – Variante 2 da ADAM23 murina do vetor pCMV6 da Origene (formas de 100 kDa e 70 kDa)

ADAMTS – Desintegrina e metaloproteinase com motivos de trombospondina, do inglês, *A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*

ADP – Difosfato de adenosina

ADLTE – epilepsia autossomal dominante lateral temporal, do inglês, *autosomal dominant lateral temporal epilepsy*

AIS – segmento axonal inicial, do inglês, *axonal initial segment*

ARF – Fator de ribosilação do ADP, proteínas GTPases, do inglês, *ADP ribosylation factor*

ATCC – Coleção de microorganismos Norte Americana, do inglês, *American Type Culture Collection*

APT – Trifosfato de adenosina

BLAST – Ferramenta básica de busca por alinhamento local, do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – Proteína albumina do soro bovino

ca. – Cerca de

C ou Cis – Domínio rico em cisteína

CD25 – receptor de interleucina 2

CDE – endocitose dependente de clatrina, do inglês, *clathrin dependent endocytosis*

CHC – Cadeia pesada de clatrina, do inglês, *clathrin heavy chain*

CIE – endocitose independente de clatrina, do inglês, *clathrin independent endocytosis*

COS-7 – Fibroblastos de rim de macaco verde

ConA – Concanavalina A-sepharose resina

Cu^{2+} – Íon cobre

DH5α – Estirpe de bactéria *E. coli*

Dis-Cys – Proteína ADAM23 recombinante contendo apenas os domínios desintegrina e cisteína

DL11C8 – Sobrenadante de hibridoma DL11C8 contendo anticorpo anti-ADAM23

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

EEA1 – Antígeno do endossomo precoce

E. coli – Bactéria *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EGF – Fator de crescimento epidermal, do inglês, *epidermal growth factor*

ELISA – Ensaio imunoenzimático, do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPTP – Epitempinas

ERC – Compartimento endocítico de reciclagem juxtenuclear, do inglês, *endocytic recycling compartment*

EV – Vetor vazio, do inglês, *Empty Vector*

GFP – Proteína verde fluorescente, do inglês, *green fluorescent protein*

GLUT1 – Transportador de glicose, do inglês, *glucose transporter*

GPI – glicofosfatidilinositol

Grb2 – Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento, é uma proteína adaptadora de ligação à clatrina, do inglês, *growth factor receptor-bound protein 2*

GSH – Glutathiona reduzida

GST – Glutathiona S transferase

GTP – Trifosfato de guanosina, do inglês, *guanosine triphosphate*

HD – Domínio hidrofóbico, do inglês, *hydrophobic domain*

HEK-293T – Célula de rim de embrião humano, do inglês, *Human Embryonic Kidney cells*

HeLa – Linhagem de células de câncer cervical, do nome, *Henrietta Lacks*

His – Histidina

HRP – Enzima peroxidase de raiz de rábano silvestre, do inglês, *Horseradish Peroxidase*

HS – Heparan sulfatado, do inglês, *Heparan Sulfate*

IgG – Imunoglobulina

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-17 – Interleucina 17

IFN- γ – Interferon gama

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo

iRNA – RNA de interferência

kB – Kilobases

λ HindIII – Marcador de alto peso molecular

LAMP1 – Proteína 1 associada à membrana do lisossomo , do inglês, *Lysosomal associated membrane protein 1*

LB – Meio Luria-Broth para cultivo de bactéria *E. coli*

Lck – Tirosina quinase linfócito-específica

LGI1 – Proteína 1 rica em leucina inativada em glioma, do inglês, *Leucine Rich Glioma Inactivated Protein 1*

LGI4 – Proteína 4 rica em leucina inativada em glioma, do inglês, *Leucine Rich Glioma Inactivated Protein 4*

mA – Miliampere

M β CD – Metil-betaciclodextrina

MCF-7 – Linhagem de fibroblastos de câncer de glândula mamária, do inglês, *Michigan Cancer Foundation-7*

MDA-MB 435 – Linhagem de fibroblasto de câncer de glândula mamária

MDA-MB 435-1C – Linhagem de fibroblasto de câncer de glândula mamária silenciada com iRNA para expressão de ADAM23

MDC – Quimiocinas derivadas de macrófagos, do inglês, *Macrophage-derived Chemokine*

MDC15 – ADAM15

MEC – Matriz extracelular

MEM – Meio mínimo essencial, do inglês, *Minimum Essential Medium*

μ g – Micrograma

μ g/ μ l – Micrograma por microlitro

MHC – Complexo de histocompatibilidade, do inglês, *major histocompatibility complex*

min – Minuto

mMDC15 – ADAM15 murina

MMP – Metaloproteinase da matriz extracelular, do inglês, *Matrix Metalloproteinases*

MP – Domínio metaloprotease

mRNA – RNA mensageiro

MW – Peso Molecular, do inglês, *Molecular Weight*

NCAM- Molécula de adesão celular neural (do inglês, *neural cell adhesion molecule*)

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês, *National Center for Biotechnology Information*

N2A – Linhagem de neuroblastoma murino, também chamada Neuro-2a

NEM – Inibidor de protease N-etil-maleimida

Ni – Níquel

PAGE – Gel de poliacrilamida, do inglês, *Polyacrylamide gel*

pb – Pares de bases

PBS – Solução salina tamponada por fosfato, do inglês, *phosphate buffered saline*

PC – Enzima pró-proteína convertase

P19 – Linhagem celular de carcinoma embrionário pluripotente

PI – Fosfatidilinositol

PI3K – Fosfatidil-inositol 3-kinase

PMSF – Inibidor de protease fluoreto de fenilmetilsulfonil, do inglês, *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

PrPc – Proteína príon celular

PSD-95 – Proteína densa pós-sináptica, do inglês, *postsynaptic density protein 95*

PtdIns3P – Fosfatidilinositol-3-fosfato

Rab4 – Endossomo de reciclagem rápida

Rab5 – Endossomo intermediário

Rab7 – Fagossomo pré-cursor do lisossomo LAMP1

Rab11 – Endossomo de reciclagem lenta

Rab35 – Endossomo de reciclagem rápida

RE – Retículo endoplasmático

RGD – Motivo tripeptídeo RGD conservado em desintegrinas que se liga às integrinas na adesão celular

RPMI – Meio de cultura, do inglês, *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SDS – Dodecil sulfato de sódio, do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*

SFB – Soro fetal bovino

SH – Domínio homólogo à Src tirosina quinase, do inglês, *SRC Homology Domain*

SH3PX – Proteína nexina adaptadora que contém os domínios SH3 e PX

SHSY-5Y – Linhagem celular de neuroblastoma humano

siRNA – Pequeno RNA de interferência, do inglês, *small interfering RNA*

SNC – Sistema nervoso central

Src – Família de tirosina quinases

STI-1/STIP-1- Fosfoproteína 1 induzida por estresse (do inglês, *stress inducible protein 1*)

TACE – Enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) também conhecida como ADAM-17, do inglês, *TNF- α Converting Enzyme*

TBST – Tampão Tris salino com Tween-20 0,05%, do inglês, *Tris Buffered Saline with Tween-20*

TCD4+ – Linfócito T CD4

TH – Linfócito T helper, resposta imunológica T helper

TM – Domínio transmembrana

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	JUSTIFICATIVA	20
1.2.	OBJETIVOS	21
1.2.1.	Objetivo geral	21
1.2.2.	Objetivos específicos	21
1.3.	MATERIAIS	21
2.	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1.	CARACTERIZAÇÃO DA ADAM23	24
2.2.	ISOFORMAS DA ADAM23	26
2.3.	PROCESSAMENTO DE ALGUMAS ADAMS: ADAM15, ADAM8, ADAM17 E ADAM23	27
2.4.	LIGANTES DE ADAM23	28
2.4.1.	Interação ADAM23 e LGI1	28
2.4.2.	Transporte axonal de ADAM22, ADAM23 e LGI1	29
2.4.3.	Interação ADAM23 e PrPc	30
2.5.	TIPOS DE ENDOCITOSE	33
2.5.1.	Endocitose independente de clatrina	33
2.5.2.	Tipos de endossomos	35
2.5.3.	Endocitose mediada por cavéola e lipid rafts	38
2.6.	ENDOCITOSE DE PRPC	40
2.7.	ENDOCITOSE DE INTEGRINAS	41
2.8.	ENDOCITOSE DAS ADAMS	44
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1.	CULTIVO CELULAR	49

3.2.	ENRIQUECIMENTO DE EXTRATOS CELULARES EM GLICOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À CONCAVALINA A-SEPHAROSE	50
3.3.	OBTENÇÃO DE EXTRATO CELULAR TOTAL	51
3.4.	OBTENÇÃO DE EXTRATO TOTAL DE CÉREBRO DE CAMUNDONGO ADULTO	52
3.5.	TRANSFEÇÃO DE HEK-293T, N2A E SHSY-5Y COM PCDNA3.1-ADAM23-HA	52
3.5.1.	Transfecção de HEK-293T por precipitação com Cálcio	52
3.5.2.	Transfecção de SHSY-5Y e N2A com Lipofectamina	53
3.6.	BIOTINILAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.....	55
3.7.	PURIFICAÇÃO DA ADAM23 RECOMBINANTE (DIS-CYS).....	57
3.8.	PURIFICAÇÃO DE MONOCLONAL ANTI-ADAM23 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À RESINA CNBR-ADAM23(DIS-CYS).	60
3.9.	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) DAS IGGS PURIFICADAS	61
3.10.	IMUNOPRECIPITAÇÃO DO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 PURIFICADO PELA RESINA DE CNBR-ADAM23(DIS-CYS) POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE.	62
3.11.	IMUNOFLUORESCÊNCIA I	62
3.12.	IMUNOFLUORESCÊNCIA II	64
3.13.	ENSAIO DO BLOQUEIO DA ENDOCITOSE DE ADAM23.....	67
3.14.	ENSAIOS DE ESTABILIDADE DA ADAM23	67
3.15.	ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOTTING</i>	68
3.16.	CITOMETRIA DE FLUXO	69
4.	RESULTADOS.....	71
4.1.	ENRIQUECIMENTO DAS FORMAS DA ADAM23 EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA 435, 435-1C E NEURONAL SHSY-5Y.	71
4.2.	PURIFICAÇÃO DA ADAM23 RECOMBINANTE (DIS-CYS).....	73
4.3.	PURIFICAÇÃO DE MONOCLONAL ANTI-ADAM23 POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À RESINA CNBR-ADAM23(DIS-CYS)-SEPHAROSE.....	74

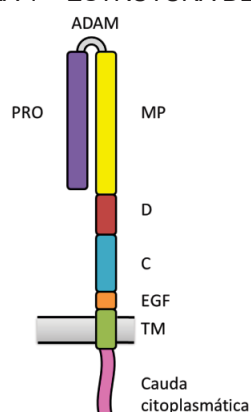
4.4.	PRODUÇÃO DE MATRIZ CROMATOGRÁFICA ANTI-ADAM23-SEPHAROSE E SEU USO EM ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO.	75
4.5.	TESTE DE EFICIÊNCIA DO <i>STRIPPING</i> DA ADAM23 BIOTINILADA DA MEMBRANA PLASMÁTICA POR DOIS DIFERENTES AGENTES REDUTORES TCEP E GSH (GLUTATIONA REDUZIDA).	79
4.6.	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM NEUROBLASTOMA MURINO N2A.	80
4.7.	CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA.	85
4.8.	TRÁFEGO INTRACELULAR DA ADAM23 POR IMUNOFLUORESCÊNCIA	88
4.9.	ENSAIO DE BLOQUEIO DA ENDOCITOSE DE ADAM23.	95
4.10.	ENSAIOS DE DEGRADAÇÃO E ESTABILIDADE DE ADAM23 NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE N2A.	97
4.11.	ENSAIOS DA ESPECIFICIDADE DO ANTICORPO ANTI-ADAM23 (DL11C8). ...	100
4.12.	AVALIAÇÃO DAS FORMAS DE ADAM23 EM CÉLULAS N2A TRATADAS COM INIBIDOR DE FURINA.	101
5.	DISCUSSÃO	104
6.	CONCLUSÕES	111
7.	PERSPECTIVAS	112
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO 1 – ARTIGO DE COLABORAÇÃO NA ÁREA SOBRE ADAM23 PUBLICADO NO PERIÓDICO NEUROSCIENCE	122
	ANEXO 2 – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BIOMOLECULES EM COLABORAÇÃO COM O GRUPO DE PESQUISA DO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA-UFPR, 2020.	123
	ANEXO 3 – ARTIGO DE PRIMEIRA AUTORIA, SUBMETIDO E ENCAMINHADO PARA REVISORES NA REVISTA EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, 2020.	124

1. INTRODUÇÃO

ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) é uma família de proteínas transmembranas envolvidas em uma variedade de funções biológicas tais como: liberação de fatores de crescimento e citocinas, desenvolvimento da musculatura e fertilização (SEALS & COURTNEIDGE, 2003). No sistema nervoso muitos membros da família ADAM parecem ter papéis importantes no desenvolvimento, regulando proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de vários tipos celulares, bem como a regulação do crescimento axonal e mielinização (YANG *et al.*, 2006).

Membros da família ADAM executam suas funções celulares através da sua topografia única, contendo um domínio metaloprotease, um desintegrina, uma região rica em cisteína, domínio semelhante ao fator de crescimento epidermal, região transmembrana e cauda citoplasmática (WOLFSBERG *et al.*, 1995) (Figura 1).

FIGURA 1 – ESTRUTURA DE ADAM.



FONTE: adaptado de (WHITE, 2003).

LEGENDA: Da região N-terminal para C-terminal: PRO: pró-domínio; MP: domínio metaloprotease; D: domínio desintegrina; C: domínio rico em cisteína; EGF: domínio do tipo EGF, semelhante ao fator de crescimento epidermal; TM: domínio transmembrana; e cauda citoplasmática.

ADAM23 é um membro da família ADAM, o qual é predominantemente expresso no sistema nervoso central durante o seu desenvolvimento e sua expressão permanece na fase adulta (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). Foi constatado que a mesma proteína possui um papel importante na diferenciação de células P19 (linhagem celular de carcinoma embrionário) e na neuritogênese de neurônios, o que sugere uma

participação tanto em eventos iniciais quanto tardios da diferenciação neuronal (SUN *et al.*, 2007).

Outro ponto que reforça a sua grande importância no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central é o fato de que camundongos deficientes para a proteína ADAM23 desenvolvem tremores e ataxia não sobrevivendo mais do que duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001). Embora o papel biológico de ADAM23 ainda não seja completamente conhecido, é possível que esta proteína atue como molécula de adesão, através do seu domínio desintegrina, já que seu domínio metaloprotease é considerado inativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000). Considerando-se a internalização de ADAM12 via clatrina e sua reciclagem através de endossomos de reciclagem rápida (Rab4) e reciclagem (Rab11) (STAUTZ *et al.*, 2012), decidiu-se investigar neste presente trabalho, a internalização de ADAM23, suas vias de reciclagem e tráfego intracelular.

1.1. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho foi desenvolvido com base nos achados para ADAM12 que demonstram que ADAM12 é internalizada via clatrina e reciclada através de endossomos de reciclagem rápida (Rab4) e reciclagem (Rab11) (STAUTZ *et al.*, 2012). Os mecanismos de internalização das ADAMs ainda devem ser melhor investigados. Endocitose é um mecanismo necessário para regular a quantidade e distribuição de proteínas sinápticas (EHLERS, 2000), e alterações da endocitose mediada por clatrina estão envolvidas em muitas doenças humanas (MCMAHON & BOUCROT, 2011).

A internalização é de fato um mecanismo que regula os níveis de ADAM23 na superfície celular. Sabe-se que a ADAM23 tem papel na adesão celular e no câncer, em tumores gástricos, de mama, cérebro e pulmão (COSTA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005; TAKADA *et al.*, 2005; VERBISCK *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2011). Também está demonstrado que a ADAM23 tem um papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso (MITCHELL *et al.*, 2001; OWUOR *et al.*, 2009; KEGEL *et al.*, 2014).

A regulação da expressão de ADAM23 na membrana e o processo de endocitose e reciclagem da ADAM23 dessas células podem estar relacionados à severidade dessas condições clínicas. Por isso, considera-se importante o estudo e descrição das vias de

regulação e reciclagem da quantidade de ADAM23 de superfície como potenciais alvos terapêuticos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

Identificar as vias/mecanismos de internalização da desintegrina e metaloprotease ADAM23.

1.2.2. Objetivos específicos

- Comprovar a especificidade do monoclonal anti-ADAM23 (DL11C8).
- Comprovar a presença de ADAM23 endógena na membrana e no citoplasma.
- Avaliar a cinética de internalização da ADAM23.
- Investigar as vias de internalização e o tráfego intracelular da ADAM23 através da co-localização com proteínas de endossomos precoces, tardios e de reciclagem.
- Avaliar o tempo de estabilidade e meia-vida da ADAM23 na membrana plasmática.
- Avaliar a inibição da endocitose por clatrina com inibidores específicos.
- Identificar parceiros moleculares de ADAM23 durante a endocitose e o tráfego intracelular.

1.3. Materiais

Células: N2A, HEK 293T, SHSY-5Y.

Reagentes e materiais: Placa de petri p100 e placa de 24-well (NEST); DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco alta glicose, Gibco); 2 mM de L-glutamina; 10% de SFB (soro fetal bovino, Gibco); 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l); 0,1 mM aminoácidos não-essenciais (Invitrogen); 1,0 mM de piruvato de sódio; 1% Penicilina-streptomicina (Pen/Strep, Life Technologies); meio MEM (*Minimum Essential Medium*, Sigma); PBS 1X (Gibco); tampão

de lise RIPA (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4); inibidores de protease (coquetel Roche); agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences); microcentrífuga Sorvall (Thermo scientific); Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen); PBS²⁺ (1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM CaCl₂); 1mM biotina *EZ-LinkTM Sulfo-NHS-SS-Biotin* (Pierce, Thermo Scientific); glicina (Sigma); Solução de *Stripping* (50 mM L-glutathione reduzida; 75 mM NaCl; 80 mM NaOH; 1% BSA; pH 8,6); Novex Streptavidina-Agarose (Life Technologies); glutathione reduzida GSH reduced (Sigma); microcentrífuga *Minispin Plus* (Eppendorf); eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (Biorad); meio LB (Luria-broth-ágar) (triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l); ágar (15 g/l)) com canamicina (30 µg/ml); resina de níquel-agarose Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético) (QIAGEN); IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo); prensa de French (*French press*); PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil); tampão de lise desnaturante com guanidina (6 M de hidrocloreto de guanidina; 20 mM de NaH₂PO₄; 500 mM de NaCl; pH 7,8); filtros de seringa de 0,22 µm e 0,45 µm (KASVI); resina de brometo de cianogênio CNBr-activated SepharoseTM 4B (GE, Healthcare, Uppsala, Suécia); espectrofotômetro *Hitachi U-2900 spectrophotometer* e cubetas de quartzo (HITACHI); leitor de placas Bio-Tek; resina A/G Sepharose (Invitrogen); proteína WGA conjugada com Alexa Fluor 594 (WGA-Alexa; 1:300; Invitrogen); Amicon com *cut-off* de 10 kDa (Merck-Millipore); paraformaldeído (PFA); albumina BSA (Sigma); phalloidina conjugada com Alexa Fluor 594 (Actin-red; Invitrogen); DAPI (Invitrogen); microscópio *Nikon A1RSiMP* (NIKON, Tokyo, Japan); software de imagem *Imaging Software Nis Elements 4.20* (NIKON, Tokyo, Japan); metil-beta ciclodextrina (MβCD) (Sigma); quimioluminescente Kit *West Pico* (Thermo Scientific); filme radiográfico carestream (Kodak); citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD Biosciences); reagente de ELISA TMB (Life Technologies); DMP (dimethyl pimelimidate) agente cross-ligante (Thermo Scientific).

Anticorpos primários: anti-ADAM23 (DL11C8); anti-EEA1 (Cell Signaling Technology, #C45B10); anti-Rab4 (Abcam, #ab13252); anti-Rab5 (Cell Signaling Technology, #C8B1); anti-Rab7 (Cell Signaling Technology, #D95F2); anti-Rab11 (Cell Signaling Technology, #D4F5); anti-LAMP1 (Cell Signaling Technology, #D2D11).

Anticorpos secundários: anti-IgG de camundongo (anti-mouse) conjugado com Alexa 488 (Life Technologies); anti-IgG de coelho (anti-rabbit) conjugado com Alexa 568

(Life Technologies); anti-IgG de camundongo (anti-mouse) conjugado com HRP (Sigma); anti-IgG de camundongo (anti-mouse) conjugado com FITC Alexa 488 nm (Sigma).

Plasmídeos: pcDNA3.1-ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000) com a sequência completa (*full-length*) da ADAM23 humana; vetor pCMV6-ADAM23V1-FLAG (Origene); vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene), ambos com a sequência completa (*full-length*) da ADAM23 murina e pET28-ADAM23(Dis-Cys)-6His, contendo apenas domínios desintegrina e cisteína fusionados a uma cauda de 6 histidinas.

Bactérias: *E. coli* BL21STAR (DE).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Caracterização da ADAM23

ADAM23 é um membro da família ADAM, predominantemente expresso no sistema nervoso central durante o seu desenvolvimento e sua expressão permanece na fase adulta (SAGANE *et al.*, 1998; GOLDSMITH *et al.*, 2004). ADAM23 possui um papel na diferenciação de células de carcinoma embrionário (P19) e na neuritogênese, indicando participação em eventos iniciais e tardios da diferenciação neuronal (SUN *et al.*, 2007).

Além disso, a deficiência de ADAM23 em camundongos os levou a desenvolver tremores e ataxia não sobrevivendo mais do que duas semanas após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001). É possível que um dos papéis de ADAM23 seja atuar como molécula de adesão, através do seu domínio desintegrina, já que seu domínio metaloprotease é considerado inativo (SAGANE *et al.*, 1998; CAL *et al.*, 2000).

Um dos primeiros relatos em que ADAM23 estaria atuando em processos de adesão foi apresentado por Cal e colaboradores (2000) em que essa proteína interage *in vitro* com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e promove a adesão de neuroblastomas humanos (NB-100 e SHSY-5Y) através de seu domínio desintegrina. Entretanto, outro trabalho mostrou que ADAM23 atua na modulação negativa da integrina $\alpha_v\beta_3$. Células MDA-MB 435 (linhagem tumoral de mama) tiveram a expressão de ADAM23 bloqueada e, desta forma, apresentaram um aumento na ativação da integrina $\alpha_v\beta_3$. Esse processo resultou em um maior potencial adesivo e migratório destas células na presença de vitronectina e fibronectina (VERBISCK *et al.*, 2009). ADAM23 também está envolvida em processos celulares de células do sistema imune como linfócitos e células dendríticas. Durante os eventos de ativação de células T, ADAM23 está envolvida na sinalização intracelular que desencadeiam mudanças conformacionais que favorecem a exposição do sítio de ligação ao ligante cognato (ELIZONDO *et al.*, 2016).

Outro grupo (CAYROL *et al.*, 2015) mostrou que a interação de integrinas $\alpha_v\beta_3$ como ligantes cognatos induzem a proliferação de linfoma, sugerindo um papel direto da interação da ADAM23 com células T na promoção da expansão clonal. O papel funcional da ADAM23 em células dendríticas tem sido caracterizado pelo uso de RNAi. Índices de leitura revelam que as células responsivas TCD4⁺ antígeno-específicas tiveram seus processos de ativação, proliferação e produção de citocinas prejudicados com o

knockdown de ADAM23 em células dendríticas. Estudos corroborativos determinaram que interações interrompidas entre ADAM23 em células dendríticas e $\alpha_v\beta_3$ em células T também prejudicaram esses processos. Os estudos mostraram um novo papel da interação da ADAM23 com $\alpha_v\beta_3$ como um mecanismo co-estimulatório para dirigir a ativação de células T, a proliferação e produção de citocinas. A interrupção da interação entre ADAM23 e $\alpha_v\beta_3$ resultou na redução dos eventos de ativação, expansão clonal de células T, e produção de citocinas. A perda da expressão de ADAM23 em células dendríticas resultou na redução significativa de citocinas associadas à resposta TH sob condições estimulatórias potentes TH1, TH2 ou TH17 (ELIZONDO *et al.*, 2016).

Isso condiz com achados de Elizondo e colaboradores (2016) em estudos com linfócitos T- $\gamma\delta$, que demonstram uma redução na produção de IL-4 por células T- $\alpha\beta$ com o estímulo de células dendríticas *knockdown* para ADAM23 (em condições polarizadoras TH2) (ELIZONDO *et al.*, 2016). Os resultados desse estudo mostram uma redução da ativação, proliferação e perfil de citocinas de células T CD4⁺ responsivas quando estimuladas por células dendríticas deficientes na expressão de ADAM23. Como a ADAM23 funciona como receptor de integrina, isso sugere que a interação cognata com $\alpha_v\beta_3$ tem um papel na modulação de eventos de sinalização intracelular e/ou de actina do citoesqueleto. Pode ser que a interação entre $\alpha_v\beta_3$ e ADAM23 seja necessária durante os últimos *time-points* associados com eventos moduladores de proliferação ou estados de polarização coordenados. Esses estudos identificaram a ADAM23 como expressa em populações de células dendríticas CD11c+, assim, modelos nocautes para ADAM23 podem servir nos estudos de sinalização e depressão da resposta imune (ELIZONDO *et al.*, 2016).

Existe uma questão se o rompimento da interação ADAM23- $\alpha_v\beta_3$ prejudica a produção de IL-2, que então leva ao prejuízo de respostas de proliferação. Pode ser que a interrupção dessa interação inibe a proliferação e produção de IL-2 através de eventos independentes. Outros estudos mostram uma redução da capacidade de produção de IFN- γ , IL-4 ou IL-17 em células T estimuladas por células dendríticas *knockdown* para ADAM23 versus células dendríticas normais. Isso foi correlacionado diretamente com uma baixa expressão de CD25/IL-2Ra, sugerindo uma ativação restringida e uma habilidade reduzida de proliferação (com redução da sinalização por IL-2) (ELIZONDO *et al.*, 2016).

A compreensão da função da ADAM23 faz-se necessária diante da sua importância biológica. E uma forma de desvendar esse papel é encontrar parceiros moleculares para

essa proteína. Como já foi reportado por diversos autores, a proteína ADAM23 é altamente expressa no sistema nervoso central (SAGANE *et al.*, 1998; MITCHELL *et al.*, 2001; GOLDSMITH *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2004; GHILARDI *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009) e a probabilidade de encontrar moléculas que interajam com a mesma nesse ambiente torna-se mais alta.

Nesse contexto, outros estudos sugerem uma possível interação de ADAM23 com outra proteína encontrada em abundância no SNC, a proteína príon celular (PrPc) (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2009). Dados de outro grupo mostraram por espectrometria de massa que muitas proteínas envolvidas na adesão celular e em neuritogênese estão presentes nas mesmas regiões especializadas de membrana nas quais PrPc é expresso (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2004). Inclusive nesse estudo foi apresentada a ADAM23 como uma das proteínas presentes no cérebro de camundongos listadas como possível parceira de PrPc. E em seguida, nosso grupo demonstrou a interação entre ADAM23 e PrPc na membrana plasmática (COSTA *et al.*, 2009).

2.2. Isoformas da ADAM23

O gene que expressa ADAM23 humana (*adam23*) se encontra no cromossomo 2q33 e o gene da ADAM23 de camundongo na região central do cromossomo 1, sendo que este gene ocupa um único *locus* (SAGANE *et al.*, 1999). A ADAM23 tem três isoformas expressas principalmente no encéfalo e coração, ADAM23 ou ADAM23 α (SAGANE *et al.*, 1998), ADAM23 β e ADAM23 γ (SUN *et al.*, 2004). Essas isoformas são transcritos diferentes provenientes do mesmo gene. ADAM23 β e ADAM23 γ são transcritos finais derivados da combinação de diferentes éxons, mas originados a partir do mesmo *locus* de ADAM23 α . ADAM23 β tem a sequência aminoacídica que forma o domínio transmembrana diferente da sequência de ADAM23, compartilhando 54% (13 de 24 resíduos) de similaridade entre suas sequências.

ADAM23 γ não possui o domínio transmembrana nem a cauda citoplasmática, sugerindo uma secreção dessa isoforma, enquanto que a ADAM23 α apresenta esses domínios e não parece ser secretada. ADAM23 γ apresenta diferença em seus níveis de expressão com o tempo, sendo ricamente expressa em encéfalos de embriões e de indivíduos neonatos, com níveis de expressão maiores do que ADAM23 α e ADAM23 β , sendo que os níveis de expressão da ADAM23 γ decaem após o nascimento. Durante a

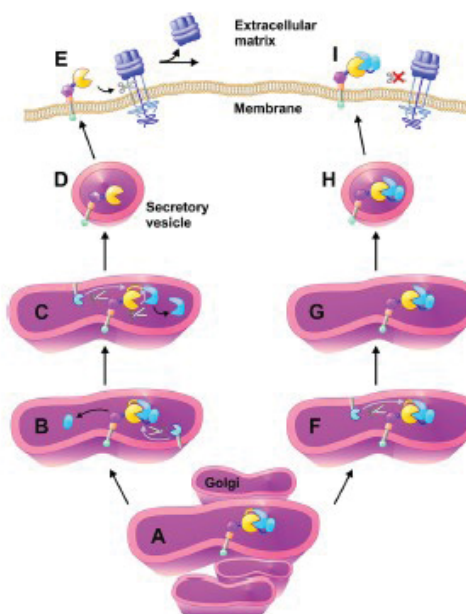
formação da rede neural aumenta o nível de expressão de ADAM23 γ , sugerindo a relevância dessa isoforma nesta etapa do desenvolvimento (SUN *et al.*, 2004).

2.3. Processamento de algumas ADAMs: ADAM15, ADAM8, ADAM17 e ADAM23

Para algumas ADAMs, o processamento por pró-proteínas convertases (PCs) do tipo furina, e, o local onde esse processamento ocorre está mais esclarecido. Para algumas ADAMs o processamento ocorre no citoplasma, na região perinuclear, na via de secreção trans-Golgi, para outras, o processamento pode ocorrer também na membrana plasmática (WONG *et al.*, 2015) (Figura 2). Para ADAM8, o processamento com a remoção do pró-domínio ocorre na via de secreção trans-Golgi (SCHLOMANN *et al.*, 2002). No caso da ADAM15 humana (através de um estudo com hMDC15-Fc, com tag de região Fc de IgG, que permite a secreção) secretada, o processamento deve ocorrer tardiamente na via secretória ou na superfície celular, uma vez que tanto a forma processada (125 kDa) quanto a forma não-processada (140 kDa) são encontradas no sobrenadante de cultura de células COS-7, mas não no extrato celular (LUM *et al.*, 1998). O processamento parece não depender de endocitose, pois a proteína fusionada hADAM15-Fc é presumivelmente liberada sem encontrar a via endocítica. Entretanto, semelhante ao padrão da ADAM15 murina que é marcada na superfície, nem toda a ADAM15 humana secretada é processada, sugerindo que uma parte do processamento da ADAM15 também pode ocorrer após a endocitose, tanto pela reciclagem através da via trans-Golgi ou em compartimentos endossomais ou lisossomais (LUM *et al.*, 1998).

Algumas furinas ou pró-proteínas convertases se localizam na membrana plasmática onde podem clivar seus alvos (LICHTENTHALER *et al.*, 2018). Por exemplo, ADAM24 (ou testase 1) é processada pela clivagem do seu pró-domínio após chegar à membrana plasmática (ZHU *et al.*, 2001). Para ADAM23 ainda não está claro o local da clivagem por pró-proteínas convertases do tipo furinas, mas sabe-se que a ADAM23 apresenta duas formas, uma processada ou madura de 70 kDa (sem o pró-domínio após a clivagem) e a forma não-processada ou imatura de 100 kDa (com o pró-domínio antes da clivagem) (GOLDSMITH *et al.*, 2004).

FIGURA 2 – ESQUEMA DA ATIVAÇÃO DA ATIVAÇÃO PRÓ-ENZIMÁTICA DA ADAM PELA REMOÇÃO DO PRÓ-DOMÍNIO.



FONTE: (WONG *et al.*, 2015).

LEGENDA: ADAMs são geradas como uma pró-enzima inativa com um pró-domínio auto-inibitório (o domínio catalítico da ADAM está representado por um círculo amarelo, o pró-domínio está representado por duas partes conectadas (azul), sendo que o sítio PC está localizado no meio (linha azul escura) e o sítio limite está conectado ao domínio catalítico (linha amarela)). Esse sítio limite é a região entre os domínios pró e metaloprotease. A remoção do pró-domínio ocorre no compartimento trans-Golgi (A) e o primeiro evento de clivagem é realizado por uma furina ou pró-proteína convertase (PC) no sítio de PC localizado acima, mais para a extremidade N-terminal da proteína (B). Isso leva a mudanças conformacionais, que expõem o sítio limite para clivagem rápida tanto por furina ou outras proteases (C). A ADAM ativada está trafegando para a membrana (D) para clivar substratos de superfície celular (E). Entretanto, quando apenas o sítio limite é clivado como ocorre no mutante do sítio da furina (*US mutant, upstream mutant*) (F) o pró-domínio permanece ligado ao domínio catalítico, formando então um complexo binário inativo fortemente ligado (G). Essa forma pseudo-pró-enzima é entregue na membrana (H), mas é incapaz de clivar substratos de superfície celular (I).

2.4. Ligantes de ADAM23

2.4.1. Interação ADAM23 e LGI1

Sabe-se que ADAM23 interage com LGI1 (Proteína 1 rica em leucina inativada em glioma, *Leucine Rich Glioma Inactivated Protein 1*) e LGI4. Essas proteínas, além de

interagirem com o receptor ADAM23, também interagem e se ligam aos receptores ADAM11 e ADAM22 (SAGANE *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009). LGI1 é uma glicoproteína secretada que consiste de repetições ricas em leucina e ricas em epitempinas (EPTP) que implicam em interações proteína-proteína na sinapse, mas ainda não havia sido descrita no segmento inicial axonal (AIS) até recentemente (SEAGAR *et al.*, 2017). LGI1 interage via suas repetições EPTP com membros da família ADAM, incluindo ADAM11, ADAM22 e ADAM23 (FUKATA *et al.*, 2006; SAGANE *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009; FUKATA *et al.*, 2017), inclusive a interação LGI1-ADAM22 induz a maturação das sinapses (LOVERO *et al.*, 2015).

LGI1 forma um complexo trans-sináptico com ADAM22 e ADAM23 controlando a força sináptica em sinapses excitatórias através da regulação da incorporação de PSD-95 (FUKATA *et al.*, 2010; LOVERO *et al.*, 2015). LGI1 localizado nos terminais pré-sinápticos age como um modulador negativo da liberação de glutamato, um efeito que pode estar ligado com Kv1 pré-sináptico (BOILLOT *et al.*, 2016). Em pacientes com encefalite autoimune, anticorpos anti-LGI1 podem romper interações com proteínas ADAM (OHKAWA *et al.*, 2013). Além disso, LGI1 é um gene humano monogênico relacionado com epilepsia, mutado na ADLTE (epilepsia autossomal dominante lateral temporal) (GU *et al.*, 2002; KALACHIKOV *et al.*, 2002; MORANTE-REDOLAT *et al.*, 2002; KEGEL *et al.*, 2013). LGI1 requer glicosilações para ser secretado e a maioria das mutações na ADTLE inibe a secreção de LGI1 através da prevenção do seu correto dobramento. Interessantemente, algumas mutações que não inibem a secreção prejudicaram as interações com ADAM22 e ADAM23 (YOKOI *et al.*, 2015; DAZZO *et al.*, 2016).

2.4.2. Transporte axonal de ADAM22, ADAM23 e LGI1

LGI1 está associado com ADAM22 e ADAM23 em vesículas de transporte axonal (HIVERT *et al.*, 2019). Esse grupo fez imagens em time-lapse de neurônios de cultura primária que após 8 dias *in vitro* (DIV8) foram transfectados com ADAM22-mCherry ou ADAM23-mCherry (com tag mCherry vermelha) para compreender os mecanismos nos seus alvos axonais. O axônio foi claramente identificado na base do seu comprimento (e estava fortemente enriquecido em vesículas de transporte em comparação com os dendritos). Além disso, a imunomarcação em tempo real da Neurofascin-186 (em azul) foi

usada para localizar com precisão o segmento axonal inicial (*axonal initial segment*, AIS) após a gravação em *time-lapse*.

Em neurônios que foram transfectados com ADAM22-mCherry, foi observado que vesículas marcadas foram transportadas axonalmente em direções anterógradas e retrógradas com uma velocidade máxima de 0.69 ± 0.1 e 0.51 ± 0.06 $\mu\text{m/s}$, respectivamente (HIVERT *et al.*, 2019). Em neurônios transfectados com ADAM23-mCherry, vesículas marcadas foram transportadas em direções anterógradas e retrógradas com velocidades máximas de 0.99 ± 0.11 e 0.53 ± 0.06 $\mu\text{m/s}$, respectivamente. Entretanto, vesículas de ADAM22 se movem bidirecionalmente na maioria dos neurônios, em contraste com vesículas contendo ADAM23, que foram transportadas principalmente na direção anterógrada por análise de quimografia.

Através de um ensaio de *time-lapse* com duas cores, com neurônios co-transfectados com ADAM23-mCherry e LGI1-GFP para visualizar o transporte axonal, foi observado que a maioria das vesículas de transporte axonal estavam co-marcadas para LGI1 e ADAM23. Análise por quimógrafo indicou que vesículas com dupla marcação se moveram bidirecionalmente em regiões axonais proximais ou distais. As velocidades máximas para os transportes anterógrados e retrógrados foram de 0.87 ± 0.09 e 0.86 ± 0.08 $\mu\text{m/s}$, respectivamente.

Hivert e colaboradores (2018) observaram que a maioria dos eventos anterógrados ocorreu em neurônios transfectados apenas com ADAM23. Em neurônios co-transfectados com ADAM22-mCherry e LGI1-GFP, foram observadas vesículas axonais co-marcadas para ambas as moléculas de adesão celular (*cell adhesion molecules*, CAMs) e transportadas principalmente de forma retrógrada. Vesículas marcadas para LGI1-GFP não foram facilmente detectadas em células transfectadas apenas com LGI1, indicando que LGI1 requer a co-expressão com ADAM22 e ADAM23 para o seu correto tráfego e transporte axonal (HIVERT *et al.*, 2019).

2.4.3. Interação ADAM23 e PrPc

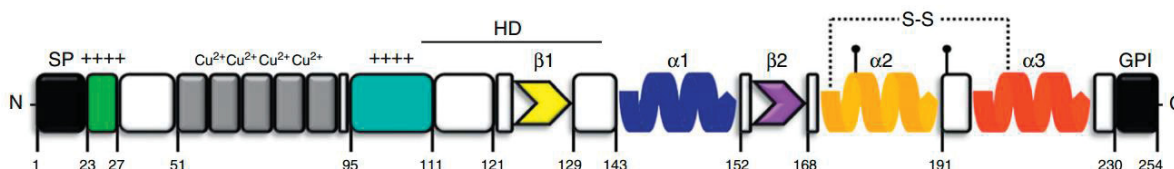
Recentemente nosso grupo caracterizou a interação *in vitro* entre ADAM23 e a proteína príon celular, contudo a função biológica desta interação ainda não está esclarecida. Essa interação direta foi elucidada através de ensaios de *pull-down* (cérebro e HEK-293T), *binding* (proteínas recombinantes 6His-PrPc e GST-ADAM23-Desintegrina),

de co-localização em microscopia confocal em neuroblastomas (Neuro-2a e SHSY-5Y) e cultura primária de neurônios (COSTA *et al.*, 2009).

A proteína príon celular (PrPc) é uma sialoglicoproteína amplamente expressa no sistema nervoso central e está envolvida em uma série de doenças neurodegenerativas (PRUSINER, 1998). PrPc pode ser clivado, sendo que o seu processamento normal no cérebro inclui a proteólise entre os resíduos 106-126, promovendo a formação de um fragmento N-terminal solúvel e a geração de um fragmento associado a membrana chamado C1 (fragmento C-terminal ligado a membrana via GPI) (HOOPER, 2005). Foi descrita a participação direta de duas desintegrinas, ADAM10 e ADAM17 (TACE), nessa clivagem normal do PrPc (VINCENT *et al.*, 2001; LAFFONT-PROUST *et al.*, 2005), bem como a participação indireta da ADAM9, pela modulação que esta exerce sobre ADAM10 (CISSE *et al.*, 2005) (Figura 3). PrPc também se associa na superfície celular à molécula de adesão neural (NCAM, do inglês, *neural cell adhesion molecule*) (SCHMITT-ULMS *et al.*, 2001), e essa interação NCAM-PrPc está envolvida no crescimento de neuritos (SANTUCCIONE *et al.*, 2005).

Além disso, sabe-se que PrPc interage com a fosfoproteína de superfície neural STI-1 (proteína 1 induzida por estresse, do inglês, *stress inducible protein 1*) promovendo a neuritogênese, a formação de neuritos, através da ativação da via de sinalização intracelular por MAPK quinase (LOPES *et al.*, 2005). E esse ligante de PrPc, STI-1 promove neuroproteção em neurônios hipocâmpais através da via de proteína quinase dependente de cAMP (ou AMP cíclico, monofosfato cíclico de adenosina) (LOPES *et al.*, 2005). É importante destacar que STI-1 é uma co-chaperona que, assim como PrPc, pode ser secretada por astrócitos, atuar como fator trófico solúvel e modular a sobrevivência e diferenciação neuronal (LIMA *et al.*, 2007). Dessa forma STI1 secretada por astrócitos medeia a sobrevivência neuronal dependente de PrPc (LIMA *et al.*, 2007).

FIGURA 3 – ESTRUTURA DE PRP.



FONTE: Adaptado de (BIASINI *et al.*, 2012).

LEGENDA: Os resíduos correspondem a uma sequência de camundongo. O peptídeo de sinal (SP, resíduos 1-22 aa), removido durante a biossíntese da PrP no retículo endoplasmático, precede uma região

polibásica verde (resíduos 23-27 aa), e cinco histidinas contendo octapeptídeos repetidos em cinza (resíduos 51-90 aa) que se podem ligar Cu^{2+} e outros íons metálicos bivalentes. A parte central da molécula inclui uma região positivamente carregada (resíduos 95-111 aa), seguido por um domínio hidrofóbico altamente conservado (HD, resíduos 111-130 aa). A parte C-terminal inclui duas folhas beta curtas (resíduos 127-129 aa em amarelo, e 166-168 aa em roxo) e três alfa-hélices (resíduos 143-152 aa em azul, 171-191 aa em laranja e 199-221 aa em vermelho). Um peptídeo C-terminal (resíduos 231-254 aa em preto) é removido durante a biossíntese, seguido por ligação de um radical de glicosilfosfatidilinositol (GPI), que ancora a proteína para o exterior do folheto membrana plasmática. PrPc também contém duas cadeias de oligossacáridos ligados a N (em Asn-180 e Asn-196, pirulitos pretos) e de uma ligação dissulfeto entre os resíduos 178 e 231 aa (indicada por uma linha tracejada).

A proteína PrPc é encontrada em microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicoesfingolipídeos, denominados *lipid rafts* ou também conhecidos como regiões de membrana resistentes à determinados detergentes (TARABOULOS *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996; NASLAVSKY *et al.*, 1997; TAYLOR & HOOPER, 2006). Essa associação com os *lipid rafts* ocorre já no início da síntese de PrPc no retículo endoplasmático, sendo necessária para o correto enovelamento da mesma (SARNATARO *et al.*, 2004).

Embora PrPc seja uma molécula encontrada em *lipid rafts* e, estes microdomínios não se apresentam recobertos por clatrina, muitos trabalhos têm demonstrado que a principal via endocítica de PrPc é mediada por vesículas recobertas por clatrina (SHYNG *et al.*, 1995; SUNYACH *et al.*, 2003; TAYLOR *et al.*, 2005; SARNATARO *et al.*, 2009).

Nossos dados preliminares sugerem que em encéfalo de camundongo ocorre uma redistribuição das duas proteínas na membrana plasmática. Nestas condições ADAM23 torna-se uma molécula parcialmente residente em frações de "*lipid rafts*" e PrPc sai em parte deste domínios.

Com base neste resultado foi observado que em células N2A, que expressam ADAM23 e PrPc, há a movimentação desta última proteína para fora dos *lipid rafts*. Dessa forma, podemos levantar a hipótese de que ADAM23 possa estar envolvida na endocitose de PrPc através de vesículas revestidas por clatrina uma vez que está promovendo a retirada da proteína destes microdomínios específicos.

Ainda na linhagem de células N2A, que expressa de forma endógena o PrPc, foi investigada a localização e a distribuição do mesmo associada a localização da molécula de ADAM23. Mais uma vez corroborando com os resultados anteriores obtidos, PrPc está localizado nas regiões de membrana que correspondem aos *lipid rafts* e ADAM23

encontra-se distribuída tanto nos *rafts* sob a forma de 70 kDa como fora dos *rafts* sob as suas duas formas de 100 e 70 kDa.

A ADAM23 transita entre domínios de membrana do tipo *lipid rafts* e não-*rafts* em amostras de regiões cerebrais dissecadas e em cultura primária de neurônios, sugerindo que a distribuição da ADAM23 na membrana pode estar envolvida na transdução de sinal na membrana neuronal. Portanto, ADAM23 faz parte de domínios de *lipid rafts* na membrana plasmática (BORGONOVO *et al.*, 2018), assim como PrPc é residente desses domínios *rafts* (KESHET *et al.*, 2000).

2.5. Tipos de endocitose

As vias endocíticas independentes de clatrina ocorrem principalmente por vias dependentes de colesterol (cavéola/flotilina dependentes). Essas vias são uma alternativa celular mediante diferentes distribuições de lipídeos e proteínas na membrana. A endocitose por diferentes vias pode ocorrer em resposta a alguma tensão membranar e/ou ao estresse celular (DOHERTY & MCMAHON, 2009).

2.5.1. Endocitose independente de clatrina

Muitas proteínas transmembranas de superfície não têm sequências citoplasmáticas para o recrutamento e internalização em vesículas revestidas de clatrina. Ao longo dos últimos anos, muitas dessas proteínas foram identificadas como sendo internalizadas por mecanismos de endocitose independente de clatrina (CIE). Parecem existir muitos mecanismos distintos de endocitose independente de clatrina (CIE) que podem refletir os diferentes tipos celulares e moléculas-cargo monitoradas. A endocitose caveolar envolve a cobertura com caveolina, é dependente de dinamina e é o mecanismo que alguns glicosfingolipídeos e vírus usam para internalização celular (MAYOR & PAGANO, 2007; SANDVIG *et al.*, 2008).

Um tipo de CIE que depende de CDC42, de fator 1 de ribosilação do ADP (ARF1) (KUMARI & MAYOR, 2008) e de actina também foi descrito, sendo independente de dinamina e responsável pela endocitose de marcadores de fase fluída, de proteínas GPI-ancoradas e toxinas bacterianas (MAYOR & PAGANO, 2007; SANDVIG *et al.*, 2008). Outro mecanismo da CIE independente de dinamina, primeiro descrito em células HeLa, é

associado com ARF6 GTPase e é responsável pela endocitose de muitas proteínas de superfície celular que não possuem sequências de reconhecimento de proteínas adaptadoras. Formas diferentes de CIE compartilham uma necessidade por colesterol livre e proteínas, e lipídeos que residem em regiões de membrana ricas em esfingolipídeos, em *lipid rafts*, parecem ser proeminentes entre as cargas na CIE (MAYOR & PAGANO, 2007; SANDVIG *et al.*, 2008). Análise recente da reciclagem de proteínas-carga endógenas na CIE (endocitose independente de clatrina) está revelando uma complexidade inesperada nos sistemas de reciclagem independente de clatrina.

A via associada a ARF6 tem sido um paradigma experimental para estudos da CIE, permitindo a identificação de muitas proteínas-cargo independentes de clatrina e a elucidação dos itinerários e mecanismos de sua reciclagem. Entre as proteínas endógenas que entram na célula pela CIE estão proteínas do complexo de histocompatibilidade MHC de classe I (RADHAKRISHNA & DONALDSON, 1997), β -integrinas (BROWN *et al.*, 2001; POWELKA *et al.*, 2004) e a proteína CD59 ancorada a GPI (NASLAVSKY *et al.*, 2004). Uma recente análise de proteômica do endossomo precoce associado a ARF6 identificou proteínas-cargo adicionais, incluindo o transportador de glicose GLuT1 (também conhecido como SLC2A1) e outras proteínas que estão envolvidas no uptake de aminoácidos e interações da células com a matriz extracelular (EYSTER *et al.*, 2009). Outras proteínas-cargo viajando nessa via, incluem a subunidade α do receptor de interleucina-2 (também conhecido como TAC) (RADHAKRISHNA & DONALDSON, 1997), a molécula CD1a (BARRAL *et al.*, 2008) e os receptores M3 muscarínico e o β 2-adrenérgico na ausência de ligantes (SCARSELLI & DONALDSON, 2009), foram identificados em células HeLa transfectadas.

Na maioria dos casos, após a internalização por vesículas distintas a carga é transferida para o endossomo precoce, onde se encontra a carga dependente de clatrina (CDE), e então pode ser direcionada ao longo da via de degradação para o lisossomo ou reciclada de volta para a superfície celular. Embora essa via independente de clatrina seja associada com ARF6, a endocitose não é dependente de ARF6-GTP; ao invés disso, é a reciclagem a partir dessa via que requer ARF6 ativada (RADHAKRISHNA & DONALDSON, 1997).

A identificação dessa via CIE foi facilitada pelo elaborado sistema tubular de reciclagem endossomal, que é facilmente visualizado em células HeLa marcadas para carga, ARF6 e/ou EHD1. Entretanto, mecanisticamente tráfegos similares dessas cargas

têm sido observados em várias outras células, incluindo COS, MCF-7 (ZIMMERMANN *et al.*, 2005), células B (WALSENG *et al.*, 2008), cardiomiócitos (GONG *et al.*, 2007), neurônios hipocâmpais (GONG *et al.*, 2007) e células dendríticas (WALSENG *et al.*, 2008) e em intestino de *C. elegans* (CHEN *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2007), indicando que existe ampla conservação dessas vias. Entretanto, em algumas células, notavelmente células CHO, ARF6 é também associada com proteínas-cargo na CDE, como TFR e influencia a reciclagem dessas proteínas-cargo (D'SOUZA-SCHOREY & CHAVRIER, 2006).

2.5.2. Tipos de endossomos

2.5.2.1. O endossomo precoce: uma estação de classificação de carga

O endossomo precoce é definido como a organela que recebe material proveniente de vesículas primárias geradas por endocitose independente de clatrina (CIE) e endocitose dependente de clatrina (CDE). A pequena GTPase Rab5, o fosfatidil-inositol 3-quinase (PI3K) e o seu produto fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P) marcam o endossomo e são necessários para a sua função. O lúmen do endossomo precoce é suavemente ácido (MAXFIELD & MCGRAW, 2004), facilitando assim mudanças conformacionais nas proteínas que podem levar à liberação do ligante de seus receptores. A seleção de proteínas de membrana e lipídeos do conteúdo do lúmen e a geração de túbulos de membrana emanando dos endossomos podem levar à entrada das proteínas de membrana e lipídeos na via de reciclagem rápida. Alternativamente, eles podem transferir para um compartimento endocítico de reciclagem tardia (ERC), localizado próximo ao núcleo, a partir do qual endossomos de reciclagem emergem.

Proteínas de membrana marcadas com monoubiquitina são encurraladas pela maquinaria eSCRT e entram na via MVB junto com o conteúdo luminal do endossomo precoce (GRUENBERG & STENMARK, 2004; SLAGSVOLD *et al.*, 2006; WOODMAN & FUTTER, 2008). Para as clássicas cargas CDE, TFRs e LDLRs, a reciclagem de volta para a membrana parece ser a via padrão e não requer nenhuma sequência citoplasmática específica para reconhecimento e seleção (MAXFIELD & MCGRAW, 2004).

Por contraste, a reciclagem de cargas e receptores de sinalização na CIE pode envolver um processo de seleção positiva. Reguladores do tráfego e de reciclagem em particular incluem GTPases (proteínas Rab e Arf) e seus efetores, a endocitose 1 mediada por receptor (RME-1) família do domínio carboxi-terminal de homologia contendo as proteínas 1-4 (EHD1-EHD4) do substrato do receptor do fator de crescimento epidermal 15 (EPs15), que são proteínas de sustentação, tubulação e talvez fissura de membrana (DAUMKE *et al.*, 2007; GRANT & CAPLAN, 2008) e proteínas motoras que transportam carregadores de reciclagem endossomal (GRANT & DONALDSON, 2009).

2.5.2.2. Via de reciclagem rápida

A existência de uma via de reciclagem rápida de volta para a membrana tanto do endossomo precoce ou de uma fase precoce na via endocítica foi documentada no transporte de TFR8 e glicosfingolipídeos (CHOUDHURY *et al.*, 2004). Estudos anteriores identificaram Rab4 como sendo importante para a reciclagem do TFR8 (VAN DER SLUIJS *et al.*, 1992) e glicosfingolipídeos (CHOUDHURY *et al.*, 2004) a partir de endossomos precoces. Não se sabe claramente o papel exato do Rab4 na reciclagem, como a expressão do negativo-dominante Rab4 inibe a reciclagem rápida, mas o *knockdown* do Rab4 mediado por RNA de interferência (siRNA) aumenta a rápida reciclagem, talvez através do bloqueio do transporte endossomo-retículo endoplasmático (ERC) (DENEKA *et al.*, 2003; YUDOWSKI *et al.*, 2009).

Estudos recentes usando RNAi e nocautes indicaram que Rab35 é um regulador importante da reciclagem rápida, e está localizado na membrana plasmática assim como em endossomos precoces sendo necessária para a reciclagem rápida do TFR de mamífero (KOURANTI *et al.*, 2006) e do receptor de gema tipo-LDL de *C. elegans* (SATO *et al.*, 2008).

A localização de Rab35 para a entrada de vesículas revestidas de clatrina liga essa rota de reciclagem rápida à endocitose dependente de clatrina (CDE). Rab35 também é associado com endossomos de reciclagem tubular ARF6 e EHD1 positivos que carregam a carga de volta à membrana plasmática na endocitose independente de clatrina (CIE) (GRANT & DONALDSON, 2009). Se Rab35 é funcional nos endossomos de reciclagem tubular ou se é apenas um passageiro, não está elucidado. Rab35 também é necessário

para uma abscisão eficiente, quebrando a ponte final que liga células filhas após a citocinese (KOURANTI *et al.*, 2006).

2.5.2.3. Via de reciclagem lenta

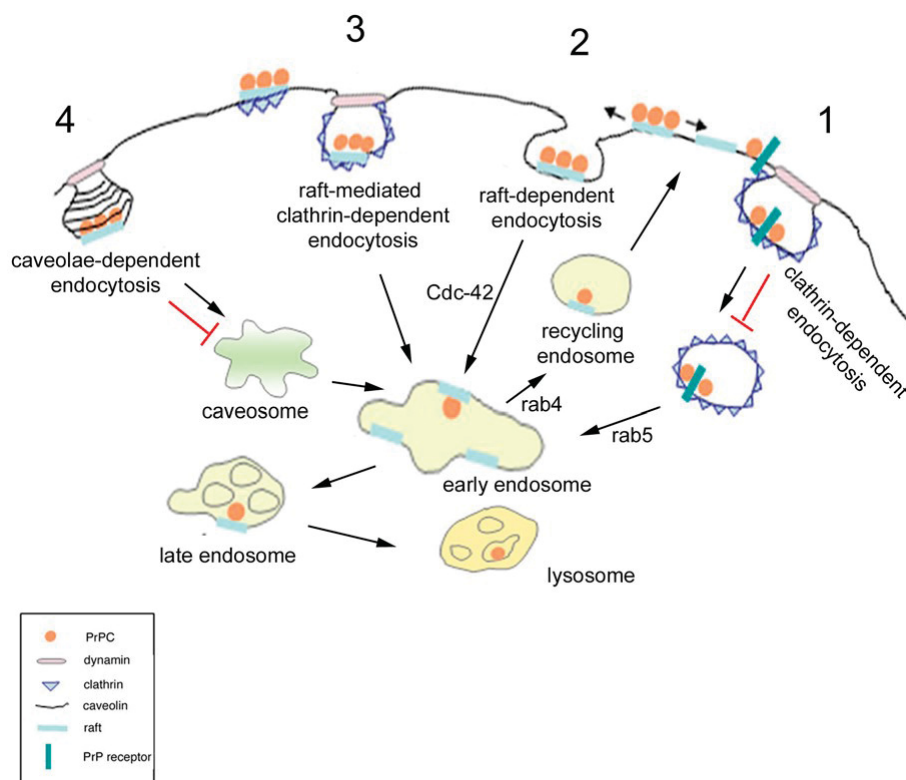
A chamada rota de reciclagem lenta é a rota tipicamente estudada para medir experimentalmente a reciclagem e envolve o transporte de proteínas do endossomo precoce para o ERC e do ERC para a membrana plasmática. Em muitas culturas de células de tecido o ERC é centralizado, perto do centro organizador de microtúbulos e do complexo de Golgi, mas esse não é sempre o caso, especialmente em células polarizadas. O modelo prevalente de classificação baseada na geometria aponta que durante a maturação o endossomo precoce expande túbulos que se tornam o ERC, ao passo que o corpo principal do endossomo precoce se torna o MVB (MAXFIELD & MCGRAW, 2004).

Evidência dessa transformação veio de estudos de imagem em tempo real, mostrando que endossomos precoces perdem Rab5 e ganham Rab11 (SONNICHSEN *et al.*, 2000). O ERC é definido molecularmente pela presença de Rab11 e/ou EHD1 e morfologicamente como um compartimento tubular que é largamente desprovido de fluido (Figura 4).

endocitose em “vesículas” caveolina1-positivas (estruturas intracelulares de pH neutro, denominadas caveosomos), tais como: o vírus SV40, subunidade B da toxina da cólera e proteínas ligadas a glicofosfatidilinositol (GPI) (KIRKHAM & PARTON, 2005; CHENG *et al.*, 2006; PARTON & SIMONS, 2007). A endocitose mediada por cavéolas já foi descrita como sendo um possível mecanismo envolvido no tráfego de PrPC (MARELLA *et al.*, 2002; PETERS *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 2007; KANG *et al.*, 2009; SARNATARO *et al.*, 2009).

A via endocítica mediada pela proteína flotilina-1 tem sido recentemente caracterizada e parece ocorrer de forma dependente de dinamina, mas independente de cavéola e clatrina (GLEBOV *et al.*, 2006; PAYNE *et al.*, 2007). Já que a mesma foi encontrada numa diferente subpopulação de endossomos tardios ricos em *lipid rafts* (FIVAZ *et al.*, 2002). Essa recentemente foi descrita como uma possível via endocítica da forma patogênica scrapie PrPsc (PIMPINELLI *et al.*, 2005) (Figura 5).

FIGURA 5 – VIAS DE INTERNALIZAÇÃO DE PRPC.



FONTE: Adaptado de SARNATARO *et al.*, 2009.

LEGENDA: A internalização da molécula pode ocorrer através de trajetos diferentes: a via clássica, mediada por clatrina (1); a via dependente de rafts (flotilina-1) (2) e a via dependente de cavéola (3). Nota-se que

todas as vias de internalização convergem ao ponto comum: os endossomos precoces e são encaminhados aos endossomos tardios e em sequência seguem para degradação via lisossomos que vão para os proteassomos.

2.6. Endocitose de PrPc

A endocitose de PrPc mediada por cavéolas, que são regiões estáveis na membrana celular associadas aos *lipid rafts*, também já foi descrita como sendo um possível mecanismo envolvido no tráfego de PrPc (HARMEY *et al.*, 1995; VEY *et al.*, 1996; PETERS *et al.*, 2003; WILSON *et al.*, 2007). As vesículas formadas por cavéolas são invaginações da membrana plasmática que contêm a proteína de revestimento caveolina-1 e estão envolvidas na endocitose não dependente de clatrina (ANDERSON, 1998).

Outro mecanismo bastante estudado referente à endocitose de PrPc é a ligação ao íon Cu^{2+} que liga-se na molécula mais precisamente na região dos octapeptídeos repetidos (resíduos 51-90 aa), como visto na Figura 3. Essa interação faz com que o PrPc saia dos *lipid rafts* e seja internalizado via vesículas revestidas por clatrina (PAULY & HARRIS, 1998; PERERA & HOOPER, 2001; TAYLOR *et al.*, 2005; HOOPER *et al.*, 2008).

Mesmo com a movimentação necessária de PrPc para fora dos *rafts* onde residem as proteínas clatrinadas, ainda faltava um elemento chave para promover sua endocitose - receptores transmembrana que pudessem conectá-lo ao espaço intracelular- já que trata-se de uma proteína ancorada à membrana. Nesse sentido que (TAYLOR & HOOPER, 2007) apresentaram a proteína LRP1 (*low-density lipoprotein receptor related protein 1*), um membro da família de receptores de lipoproteínas de baixa densidade altamente expresso em células neuronais, como sendo o receptor de PrPc responsável por promover sua endocitose via clatrina.

Contudo, outros parceiros moleculares podem estar envolvidos nesse mecanismo de internalização da proteína príon celular. Nesse sentido, seria interessante investigar a internalização PrPc mediante a ação de ADAM23. Dessa forma, também é relevante investigar com mais detalhamento as vias de internalização da própria proteína ADAM23, uma vez que, ela pode estar envolvida na internalização de seus ligantes como o PrPc.

2.7. Endocitose de integrinas

ADAM23 é conhecida por interagir com integrinas de superfície celular $\alpha_v\beta_3$ promovendo a adesão celular de neuroblastomas e astrocitomas (CAL *et al.*, 2000). Sabe-se também que ADAM23 negativamente modula a ativação na membrana da integrina $\alpha_v\beta_3$ durante a metástase (VERBISCK *et al.*, 2009). As integrinas são internalizadas via clatrina ou caveolina e podem ser direcionadas para a degradação lisossomal ou serem recicladas de volta para a membrana plasmática (DE FRANCESCHI *et al.*, 2015). O tráfego de integrinas está relacionado com a regulação dos processos de adesão e migração (PAUL *et al.*, 2015).

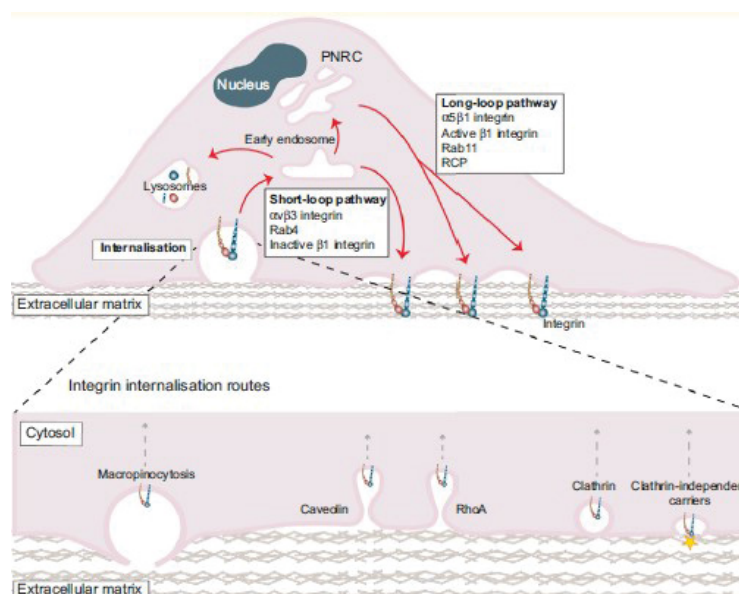
Vários reguladores da endocitose da integrina β_1 foram identificados, como a proteína nexina seletora 17 (do inglês, *sorting nexin 17*, SNX17) que dá suporte à reciclagem de β_1 (BOTTCHEER *et al.*, 2012) e a proteína seletora de carga GGA3 (do inglês, *Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding (GGA)3*) que direciona a integrina β_1 para fora de uma via de degradação, portanto, mantendo a estabilidade da integrina, a adesão focal e a migração celular (RATCLIFFE *et al.*, 2016).

A integrina β_3 por sua vez se liga a Dab2, uma proteína adaptadora de clatrina, durante a endocitose, e a regulação do seu tráfego está relacionada aos processos celulares de proliferação, invasão e metástase nas seguintes doenças: câncer epitelial de ovário, câncer de próstata, carcinoma de nasofaringe, câncer de mama, câncer de pulmão (MOK *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2002; TONG *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014; DE FRANCESCHI *et al.*, 2015). Após a internalização $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ entram no compartimento perinuclear de reciclagem (PNRC, do inglês, *perinuclear recycling compartment*) e são lentamente recicladas via Rab11 e PKB/Akt ou rapidamente recicladas via Rab4 (WOODS *et al.*, 2004).

O estímulo com fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) induz a fosforilação do efetor de Rab5 (rabaptin-5) e a subsequente formação do complexo rabaptina-5–Rab5–Rab4 (CHRISTOFORIDES *et al.*, 2012). Através desse complexo, a integrina $\alpha_v\beta_3$ é entregue na superfície de células migratórias e permite a invasão em microambientes carentes em fibronectina (CHRISTOFORIDES *et al.*, 2012). A internalização e reciclagem da integrina β_1 , por sua vez, é importante para a manutenção dos níveis de β_1 na superfície celular e eventos de adesão e migração celular (DE FRANCESCHI *et al.*, 2015).

A reciclagem de integrinas de volta à membrana plasmática ocorre por dois mecanismos espacialmente e temporalmente distintos frequentemente referidos como vias de alça curta e alça longa (CASWELL & NORMAN, 2006; MORGAN *et al.*, 2009; SCITA & DI FIORE, 2010). A reciclagem pela via curta é dependente de Rab4 e promove a rápida entrega de receptores de volta à membrana plasmática. Alternativamente, receptores entrando na via longa são direcionados para compartimentos de reciclagem perinuclear (PNRC, do inglês, *perinuclear recycling compartments*) Rab11-positivos, antes de retornarem à superfície celular (Figura 6). Essas vias de reciclagem facilitam a alternância na adesão e abastecem a célula com uma constante quantidade de integrinas para a interação com a matriz extracelular e a geração de novas adesões.

FIGURA 6 – TRÁFEGO DE INTEGRINAS.



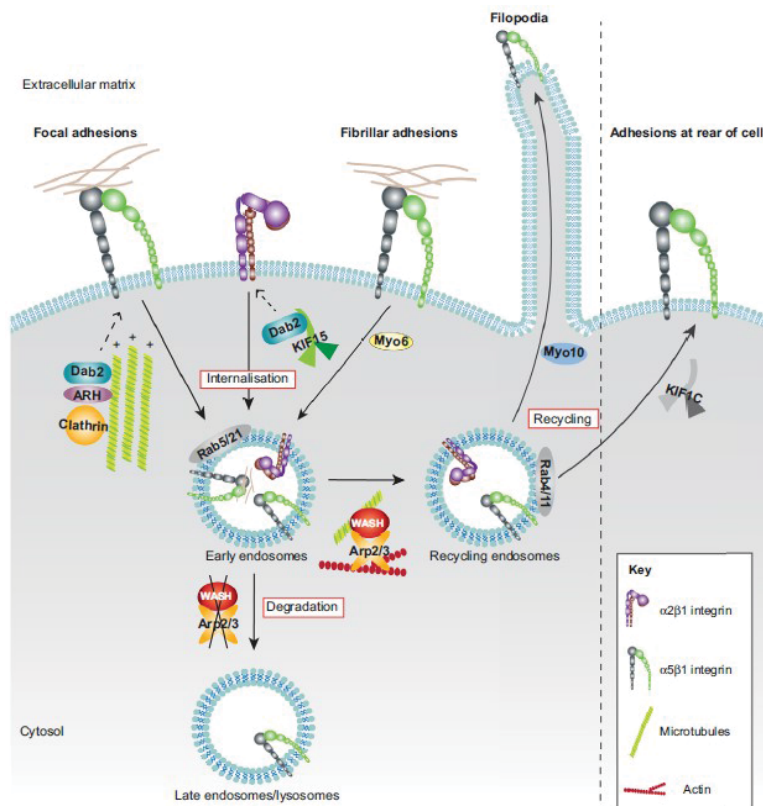
FONTE: DE FRANCESCHI *et al.*, 2015.

LEGENDA: A reciclagem de integrinas de volta à membrana plasmática ocorre por dois mecanismos espacialmente e temporalmente distintos frequentemente referidos como vias de alça curta (*short-loop pathway*) e alça longa (*long-loop pathway*). A reciclagem pela via curta geralmente está relacionada com a integrina $\alpha\beta_3$, é dependente de Rab4 e promove a rápida entrega de receptores de volta à membrana plasmática. Alternativamente, receptores como a integrina $\alpha_5\beta_1$ que entram na via longa são direcionados para compartimentos de reciclagem perinuclear (PNRC) Rab11-positivos, antes de retornarem à superfície celular

A endocitose de integrinas a partir de adesões focais (FAs) é promovida por microtúbulos acetilados e adaptadores como Dab2 e ARH. O motor dos microtúbulos a cinesina KIF15 promove a endocitose de integrinas inativas entregando Dab2 a esses receptores, enquanto Myo6, um motor de actina, medeia a internalização de integrinas $\alpha_5\beta_1$ a partir de adesões fibrilares. Com relação à reciclagem, no compartimento do endossomo precoce, o recrutamento da proteína Arp2/3 mediado pelo complexo protéico WASH e a subsequente reorganização de actina mediada por Arp2/3 dirige o tráfego de integrinas para os endossomos de reciclagem.

Vários mecanismos dão suporte à reciclagem de integrinas de volta à membrana plasmática. Por exemplo, KIF1C promove a reciclagem de $\alpha_5\beta_1$ para a parte posterior de células em migração para a maturação da adesão focal e Myo10 leva as integrinas para a ponta dos filopódios (Figura 7). Porém, na ausência do complexo WASH, as integrinas são re-direcionadas para a via de degradação (DE FRANCESCHI *et al.*, 2015).

FIGURA 7 – PAPEL DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO NO TRÁFEGO DE INTEGRINAS



FONTE: DE FRANCESCHI *et al.*, 2015.

LEGENDA: A endocitose de integrinas a partir de adesões focais (FAs) é promovida por microtúbulos acetilados e adaptadores como Dab2 e ARH. O motor dos microtúbulos a kinesina KIF15 promove a endocitose de integrinas inativas entregando Dab2 a esses receptores, enquanto Myo6, um motor de actina, medeia a internalização de integrinas $\alpha 5 \beta 1$ a partir de adesões fibrilares. No endossomo precoce, o recrutamento da proteína Arp2/3 mediado pelo complexo WASH e a reorganização de actina mediada por Arp2/3 promove o tráfego de integrinas para os endossomos de reciclagem (*recycling endosomes*). KIF1C promove a reciclagem de $\alpha 5 \beta 1$ para a parte posterior de células em migração para a maturação da adesão focal e Myo10 (em azul) leva as integrinas para a extremidade dos filopódios. Na ausência ou bloqueio do complexo WASH, as integrinas são re-direcionadas para os endossomos tardios (*late endosomes*) e via de degradação lisossomal.

2.8. Endocitose das ADAMs

Os mecanismos de internalização das ADAMs ainda precisam ser melhor investigados. A endocitose é um processo necessário para a regulação da quantidade e distribuição de proteínas sinápticas (EHLERS, 2000). Assim, alterações das proteínas de endocitose mediada por clatrina estão envolvidas em muitas desordens fisiológicas

humanas (MCMAHON & BOUCROT, 2011). Proteínas da maquinaria endocítica (clatrina, complexo endocítico da proteína adaptadora de clatrina AP2 e dinamina-2) estão presentes em zonas endocíticas localizadas lateralmente a regiões de densidades pós-sinápticas (PSDs) em espinhas dendríticas (BLANPIED *et al.*, 2002; RACZ *et al.*, 2004), e endocitose dependente de clatrina regula a plasticidade sináptica. Esse tipo de endocitose é necessário para a desregulação dos receptores AMPA que a um decréscimo na fosforilação das subunidades do AMPAR, na depressão sináptica de longa duração (*long-term depression*, LTD) (CARROLL *et al.*, 1999; BEATTIE *et al.*, 2000).

A endocitose mediada por clatrina na doença de Alzheimer (AD) é regulada por genes, dentre os quais está PICALM, o gene de uma proteína adaptadora que se liga à clatrina, fosfoinositol, e à proteína adaptadora de clatrina AP2 para montar as vesículas revestidas de clatrina (HAROLD *et al.*, 2009). Outros estudos mostraram que a ADAM10 se liga diretamente à proteína adaptadora de clatrina AP2 induzindo a internalização da enzima que está alterada no hipocampo de pacientes com Alzheimer. Está descrito que a estimulação de células com Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) potencializa a internalização e degradação de ADAM17 comparada com células não-tratadas (DOEDENS & BLACK, 2000). A ADAM12, por exemplo, também induz o tráfego do receptor tipo II do fator transformador de crescimento β (*transforming growth factor β type II receptor*, T β RII) para os endossomos precoces (ATFI *et al.*, 2007).

Alguns estudos mostraram que o silenciamento de ADAM9 em células PC3 e em fibrosarcoma causou a redução da internalização da integrina β 1, um subsequente atraso na degradação lisossomal, alteração na adesão focal e formação de fibras de estresse (ROBERTS *et al.*, 2001; MYGIND *et al.*, 2018). Dessa forma, sugere-se que ADAM9 é um regulador da endocitose da integrina β 1 e se submete a uma internalização constitutiva dependente de clatrina com cinética de internalização similar à da integrina β 1 (MYGIND *et al.*, 2018). ADAM9 também foi demonstrada regulando o tráfego intracelular da proteína E-caderina (HIRAO *et al.*, 2006). Aparentemente as proteínas ADAMs parecem ter um papel regulatório durante a endocitose.

Para poucas ADAMs o processo de endocitose está um pouco mais estudado, como é o caso da ADAM12, cujo tempo em que ocorre o pico de internalização está descrito como sendo de 1 hora após o início desse processo celular em células 293VnR expressando a ADAM12 completa com todos os domínios (*full-length*). A ADAM12, assim como a ADAM23, passa por um processamento, sendo clivada por proteases e está

presente na célula sob duas formas, a pró-forma (forma imatura) de 150 kDa (proA12) e a forma madura de 120 kDa (matA12). É importante destacar que o pico de internalização da ADAM12 foi observado apenas para sua forma madura/processada que é residente da membrana plasmática, uma vez que existe uma menor quantidade celular da pró-forma em relação à forma madura, além de que a pró-forma parece não estar presente na membrana plasmática com base em ensaios de biotilação de proteínas de superfície celular seguidos de ensaios de internalização por *western blot*.

Ainda para a ADAM12, sabe-se que a internalização ocorre via clatrina e que, após a internalização, a mesma co-localiza com endossomos precoces que expressam a proteína antígeno 1 de endossomos precoces (EEA1) e, subsequentemente, com endossomos de reciclagem que expressam Rab4 e Rab11 (STAUTZ *et al.*, 2012). Como a estrutura da ADAM12 é muito semelhante à da ADAM23, torna-se interessante investigar se para a ADAM23 o processo de endocitose ocorre de forma parecida e se também é via clatrina. Como o processo de tráfego intracelular da ADAM23 ainda não está totalmente elucidado seria importante investigar as vias endossomais que a ADAM23 pode seguir dentro da célula e comparar com o tráfego e a localização da ADAM12.

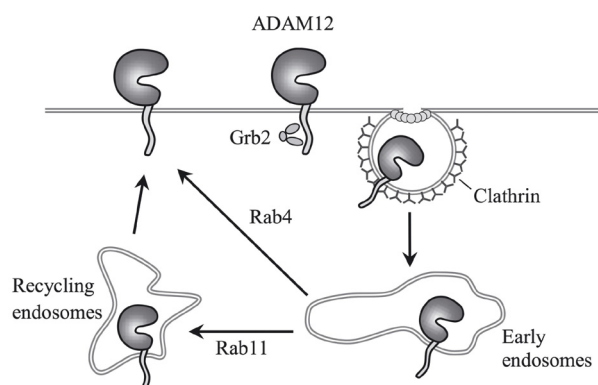
Sabe-se que a ADAM12 é internalizada via clatrina e que se localiza em microdomínios de membrana resistentes a detergentes, como os *lipid rafts* (ALBRECHTSEN *et al.*, 2011). Com o objetivo de avaliar se a ADAM12 era internalizada também via cavéola, Stautz e colaboradores, 2012 realizaram a depleção do colesterol de membrana com o tratamento com metil- β -ciclodextrina (M β CD) inibindo assim a internalização da ADAM12 via cavéola (YANCEY *et al.*, 1996; RODAL *et al.*, 1999; WESTERMANN *et al.*, 2005) e clatrina (RODAL *et al.*, 1999).

Esses autores viram que o tratamento com M β CD resultou em uma inibição quase total da internalização de ADAM12-GFP. Além disso, para testar se a ADAM12 era internalizada via cavéola, eles reduziram os níveis de caveolina-1 através de silenciamento com RNA de interferência (siRNA). O resultado encontrado foi que esse silenciamento não afetou a internalização da ADAM12-GFP, indicando que a ADAM12 realmente não é internalizada via cavéola. Além da ADAM12, muitos receptores de membrana de fatores de crescimento e receptores de tirosina-quinases são internalizados por uma via dependente de clatrina (BENMERAH & LAMAZE, 2007; SCHMID & MCMAHON, 2007; UNGEWICKELL & HINRICHSSEN, 2007), por isso, seria interessante avaliar também se a ADAM23 pode seguir a mesma rota.

Sabe-se ainda que os sítios de ligação ao domínio SH3 localizados na cauda citoplasmática da ADAM12 são importantes para a sua internalização, uma vez que esses sítios interagem com os domínios SH3 da proteína adaptadora da sinalização intracelular, a proteína Grb2. A proteína Grb2 está claramente envolvida na endocitose da ADAM12 juntamente com a clatrina. Além disso, os domínios SH3 da Grb2 interagem especificamente com as regiões ricas em prolina da cauda citoplasmática da ADAM12. Assim, a ADAM12 é internalizada via clatrina e Grb2, onde Grb2, através de 2 domínios SH3 se liga a duas moléculas de ADAM12 ou se liga a dois sítios dentro da mesma molécula de ADAM12.

Com relação ao tráfego intracelular logo após a internalização, a ADAM12 se localiza em endossomos precoces sendo subsequentemente reciclada através de ambas as vias de reciclagem rápida (endossomo Rab4-positivo) e lenta (endossomo Rab11-positivo) (Figura 8) (STAUTZ *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a ADAM15 também interage com Grb2, mas nada foi demonstrado a respeito de sua internalização se também é via clatrina.

FIGURA 8 – MECANISMO PROPOSTO PARA A INTERNALIZAÇÃO CONSTITUTIVA E RECICLAGEM DA ADAM12.



FONTE: STAUTZ *et al.*, 2012.

LEGENDA: ADAM12 é internalizada por uma via mediada por clatrina e Grb2, onde Grb2, através de 2 domínios SH3 se liga a duas moléculas de ADAM12 ou se liga a dois sítios dentro da mesma molécula de ADAM12. Após a internalização, a ADAM12 se localiza em endossomos precoces e é subsequentemente reciclada através de ambas as vias de reciclagem rápida (Rab4) e lenta (Rab11).

Considerando o papel da ADAM23 no câncer e em doenças neurológicas, o potencial da sua atividade na membrana plasmática, especialmente interagindo com

integrinas em processos de adesão celular, sua localização na superfície celular, sua internalização e reciclagem provavelmente são mecanismos bem controlados. Assim, o estudo da regulação das vias de endocitose e reciclagem da ADAM23 pode ser de importância clínica. Dessa forma, o presente trabalho visou a descrição da via de internalização da ADAM23 e seu tráfego intracelular após a internalização, como potenciais alvos terapêuticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

A linhagem de neuroblastoma murino, Neuro-2a (N2A) (ATCC® CCL-131™) foi cultivada segundo as normas da ATCC com meio DMEM (Meio Eagle Modificado Dulbecco alta glicose - Gibco) contendo 2 mM de L-glutamina, 10% de SFB (soro fetal bovino, Gibco), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), 0,1 mM aminoácidos não-essenciais (NEAA, *Non-Essential Amino Acids Solution* 1X) (Invitrogen), 1,0 mM de piruvato de sódio, 1% de Penicilina-streptomicina (Pen/Strep, Life Technologies); pH 7,2, incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. A linhagem de neuroblastoma humano derivado de medula óssea SHSY-5Y (ATCC® CRL-2266™) foi cultivada da mesma forma e com o mesmo meio que a linhagem N2A, porém com 15% de SFB.

A linhagem HEK-293T de rim de embrião humano (do inglês, *Human Embryonic Kidney cells*) (293tsA1609neo - ICLC HTL04001) foi cultivada em Meio MEM (*Minimum Essential Medium* - Sigma) contendo 10% de SFB (soro fetal bovino), 10 mM NaHCO₃ (1,5 g/l), pH 7,2, gamicina (40 µg/ml) (Scheringh-Plough) e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

As linhagens de câncer de mama, MDA-MB-435 e MDA-MB-435-1C (linhagens ATCC® HTB-129™) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) contendo 10% de SFB, insulina recombinante humana (0,01 mg/ml) (NPH Humulin N, Lilly) e gamicina (40 µg/ml). A linhagem de câncer de mama MDA-MB-435-1C foi obtida de um clone que contém RNAi para ADAM23, ou seja, que não expressa ADAM23 permanentemente silenciado para ADAM23. A linhagem 435-1C contém o gene de resistência para o antibiótico geneticina G418 e foi cultivada com esse antibiótico para manter o silenciamento do gene *adam23*. O antibiótico G418 bloqueia a síntese de polipeptídeo, inibindo a síntese de proteína no nível dos ribossomos 70S e 80S, interferindo na função ribossomal e na elongação da proteína. É utilizado na manutenção e seleção de células eucarióticas transfectadas com genes de resistência para a neomicina.

As linhagens 435 foram utilizadas na avaliação do enriquecimento das formas de ADAM23 por cromatografia de afinidade à concanavalina A-sepharose, resina que tem alta afinidade pelos sítios glicosilados da proteína ADAM23.

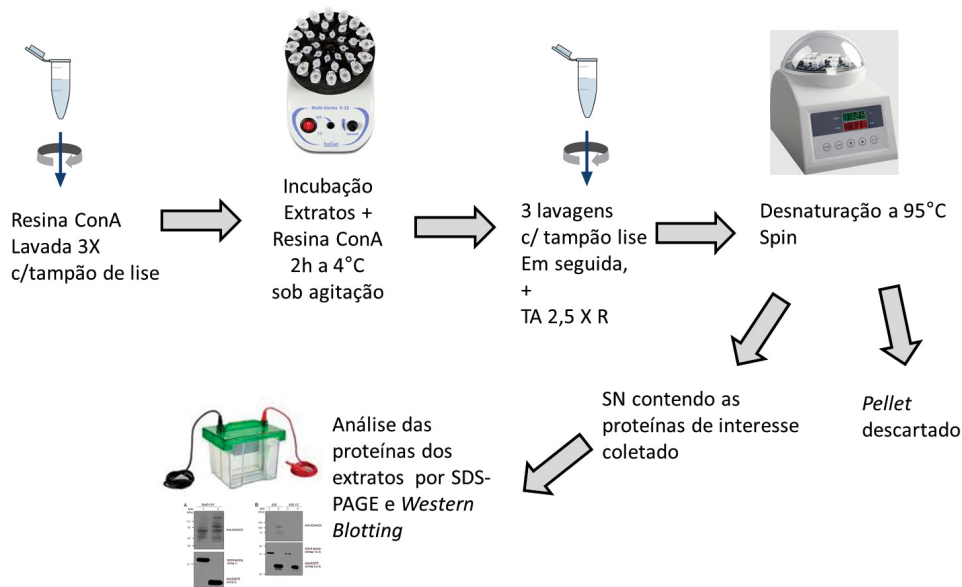
As linhagens N2A, SHSY-5Y, HEK-293T e 435 foram todas obtidas da ATCC.

A linhagem de hibridoma DL11C8 secretor do anticorpo monoclonal anti-ADAM23 (que reconhece especificamente os domínios desintegrina e cisteína), foi produzida em nosso laboratório em trabalhos prévios e caracterizada recentemente (BORGONOV *et al.*, 2018). Essa linhagem foi cultivada em meio RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*) contendo 10% de SFB, 1% de Pen/Strep e 2 mM e L-glutamina.

3.2. Enriquecimento de extratos celulares em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose

Os extratos de células 435 e 435-1C foram lisados e enriquecidos em glicoproteínas com concanavalina A-sepharose (ConA) de forma individual adicionando-se a esse volume 40 µl de resina. Essa resina foi previamente lavada com tampão de lise (contendo inibidores de proteases) por 3 vezes e centrifugada a 5.000 rpm por 2 minutos em microcentrífuga *Minispin Plus* (Eppendorf), para equilibrá-la. As amostras com a ConA foram incubadas em orbital a 4°C por 3 horas. Cada amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante “*void*” foi coletado. Logo após, a resina foi lavada 3 vezes com 50 µl do mesmo tampão em centrifugações de 5.000 rpm por 2 minutos. Por fim a resina foi ressuspensa em 50 µl tampão de amostra 2,5 X redutor (contendo β-mercaptoetanol). As amostras foram então desnaturadas a 95°C por 10 minutos centrifugadas a 13.000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante foi coletado e analisado por SDS-PAGE (Figura 9).

FIGURA 9 – ESQUEMA DA CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À CONCAVALINA A-SEPHAROSE OU ENRIQUECIMENTO EM GLICOPROTEÍNAS.



FONTE: A autora, 2017.

LEGENDA: A resina concanavalina A-sepharose tem afinidade pelos sítios glicosilados presentes em ambas as formas processada (70 kDa) e não-processada (100 kDa) da proteína ADAM23. Essa resina liga-se eficientemente à ADAM23, separando-a por precipitação das demais proteínas dos extratos celulares.

Dessa forma, foi utilizada objetivando-se o enriquecimento dessas formas de ADAM23.

3.3. Obtenção de extrato celular total

As células foram lavadas com 2 vezes PBS 1X, e em seguida, foi adicionado 400 µl de tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4) com inibidores de protease (coquetel Roche). Em seguida, foram lisadas mecanicamente através de passagens em seringa com agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40 min. em banho de gelo com intervalo de 10 min. cada. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 13.400 rpm por 10 minutos a 4°C, na microcentrífuga Sorvall. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para o microtubo.

3.4. Obtenção de extrato total de cérebro de camundongo adulto

O uso dos camundongos para obtenção do cérebro foi aprovado pelo CEUA com o código referente ao trabalho de outro membro do grupo de pesquisa. Sendo este trabalho aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas sob o código número 888 e identificado com o processo 23075.073824/2015-15. O cérebro foi pesado (aproximadamente 70 mg) e lavado em PBS 1X gelado em seguida foram adicionados 800 µl de tampão de lise (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40); 0,5% de Triton X-100; pH 7,4) com inibidores de protease (coquetel Roche) sendo lisado mecanicamente através de passagens em seringa com agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40' em banho de gelo com intervalo de 10' cada. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 13.400 rpm por 10 minutos a 4°C, na microcentrífuga Sorvall. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para o microtubo.

3.5. Transfecção de HEK-293T, N2A e SHSY-5Y com pcDNA3.1-ADAM23-HA

Ambas as células foram contadas e plaqueadas um dia antes da transfecção, sempre 3×10^5 células/por placa de petri com área de 35x10 mm (p35). As células HEK-293T foram transientemente transfectadas com pcDNA3.1-ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000), contendo a sequência completa da ADAM23 humana com cauda “tag” de hemaglutinina, por precipitação por cálcio e as SHSY-5Y e N2A com lipofectamina. As linhagens HEK-293T, SHSY-5Y e N2A foram cultivadas conforme descrito no item sobre cultivo celular. Para as transfecções de ambas as linhagens foram feitos controles negativos não-transfectados. Após as transfecções, as células foram incubadas por 48 horas antes dos ensaios, pois esse é o tempo de expressão de uma quantidade maior de ADAM23 ideal para detecção. Após 24 horas apenas, a quantidade de ADAM23 superexpressa é baixa.

3.5.1. Transfecção de HEK-293T por precipitação com Cálcio

As células HEK-293T foram transientemente transfectadas com o plasmídeo pcDNA3.1-ADAM23-HA (CAL *et al.*, 2000) por co-precipitação de fosfato de cálcio como

previamente descrito (PUSCHEL *et al.*, 1995). Uma alíquota 3 µg do plasmídeo de interesse foi adicionado na superfície de 125 µl de água ultrapura estéril, seguido de 41,7 µl de solução 1 M CaCl₂ e 166,7 µl de solução BBS 2X concentrada (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1 mM Na₂HPO₄; pH 6,95). Após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente, foram adicionados 1,3 ml de meio respectivo acrescido de 10% (v/v) de soro fetal bovino. As placas de Petri de 35 cm² contendo as células com confluência de aproximadamente 70% tiveram os seus meios de cultura aspirados, e em seguida, adicionou-se a elas a solução descrita acima. Cada placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi novamente aspirado e a placa foi cuidadosamente lavada com 1 ml de PBS 1X. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio novo e cada placa foi incubada na estufa por 48 horas (2 dias).

3.5.2. Transfecção de SHSY-5Y e N2A com Lipofectamina

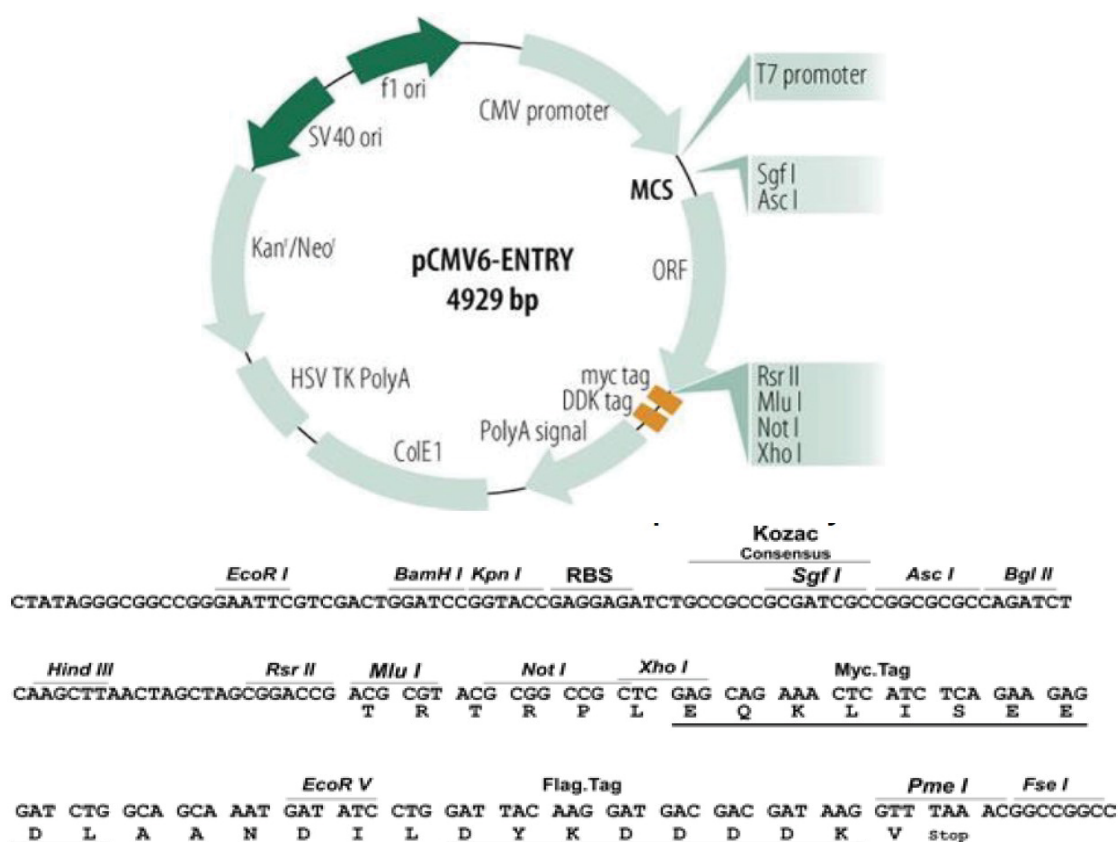
Tanto para N2A como para SHSY-5Y a transfecção foi transientemente feita de forma igual. Para cada placa de petri p35 foram feitos sempre 2 tubos tipo Eppendorf: o tubo 1 contendo 250 µl de meio de transfecção OPTIMEM sem antibiótico e 3 µg de plasmídeo; o tubo 2 contendo 250 µl do mesmo meio com 6 µl de Lipofectamina *Lipofectamine® 2000 Reagent* (Invitrogen). Em seguida, para cada placa o conteúdo dos tubos 1 e 2 foram misturados e incubados em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, o meio de cultura das placas foi aspirado e as mesmas lavadas com PBS 1X. Adicionou-se então a cada placa 1 ml de meio de transfecção (DMEM alta glicose com 10% (v/v) de SFB, piruvato 1X, aminoácidos não-essenciais, sem antibiótico).

Após os 20 minutos de incubação, adicionou-se a cada placa a mistura 1+2. Cada placa foi incubada durante 5 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi novamente aspirado e a placa foi cuidadosamente lavada com 1 ml de PBS 1X. Em seguida, adicionou-se 1 ml de meio DMEM alta glicose com ou sem 10% (v/v) de SFB, com piruvato, com aminoácidos não-essenciais, sem antibiótico (meio completo da célula sem antibiótico). Cada placa foi incubada na estufa por 48 horas (2 dias).

Para SHSY-5Y, a única diferença foi que o meio completo da célula tinha 15% de SFB ao invés de 10%. Para SHSY-5Y a transfecção foi feita com o vetor pcDNA3.1-ADAM23-HA que contém a sequência inteira da ADAM23 humana, o mesmo usado em

HEK293T. Entretanto, em HEK293T e em N2A também foi utilizado o vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene). HEK293T também foi transfectada com o vetor pCMV6-ADAM23V1-FLAG (Origene). Esses vetores com ADAM23V1 e ADAM23V2 possuem a sequência completa da ADAM23 murina e diferem na região transmembrana e cauda citoplasmática. O *backbone* do vetor assim como o sítio de policlonagem podem ser observados no mapa do vetor logo a seguir (Figura 10).

FIGURA 10 – MAPA DO VETOR pCMV6-ENTRY E O SÍTIO DE POLICLONAGEM USADO COM OS INSERTOS ADAM23V1 E ADAM23V2.



FONTE: Fabricante Origene.

LEGENDA: Em detalhes é possível ver que esse plasmídeo tem um promotor de citomegalovírus (CMV) e caudas de myc e FLAG na região C-terminal. Esse vetor já veio do fabricante contendo as sequências da ADAM23 V1 e V2.

3.6. Biotinilação de proteínas de superfície celular

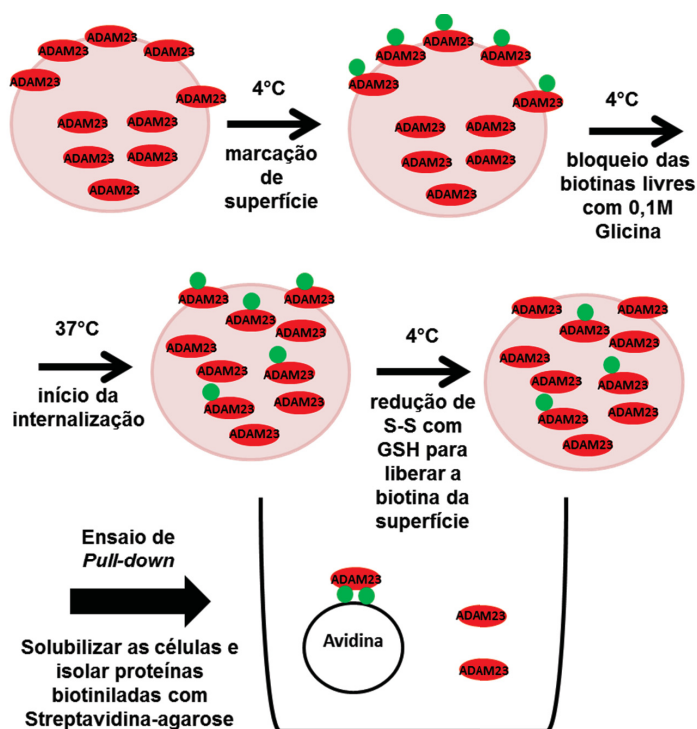
Com o objetivo de realizar o ensaio de cinética de internalização da ADAM23 a partir da membrana plasmática, foi realizada uma marcação de proteínas de superfície celular com biotina em células de neuroblastomas humano (SHSY-5Y) e murino (N2A) e células HEK-293T, todas transientemente transfectadas com ADAM23, com base nos protocolos descritos por GABRIEL e colaboradores, 2009 e por STAUTZ e colaboradores, 2012. Dois dias ou 48 h após a transfecção, as células foram mantidas aderidas na placa de cultura, foram primeiramente pré-incubadas a 4°C por 15 min., para parar o processo de internalização. Em seguida, foram lavadas com PBS²⁺ (1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM CaCl₂) gelado com pH 8,2 e incubadas com 1 mM de biotina *EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin* (Pierce, Thermo Scientific) em PBS²⁺ gelado pH 8,2 por 30 minutos a 4°C.

As células foram então lavadas 3 vezes de 5 minutos com solução de bloqueio com 0,1 M de glicina em PBS²⁺ (1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM CaCl₂) gelado pH 8,2, para garantir o bloqueio das biotinas livres. Em seguida, foi adicionado meio completo das células SHSY-5Y a cada placa e as mesmas foram submetidas à internalização, sendo incubadas a 37°C pelos seguintes tempos: 0, 15, 30 e 60 minutos. Além disso, foram feitos os controles não-biotinilado e um controle biotinilado e incubado com meio de cultivo completo a 4°C em vez de 37°C, sendo este o controle negativo da internalização, a qual não deve ocorrer em temperaturas muito baixas.

Após a incubação de internalização, as células foram lavadas uma vez com PBS²⁺ gelado pH 8,2. Em sequência, as células foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com uma solução que remove a biotina das proteínas ou solução de *Stripping* (50 mM L-glutathione reduzida; 75 mM NaCl; 80 mM NaOH; 1% BSA; pH 8,6) (STAUTZ *et al.*, 2012), sendo essa solução importante por conter um forte agente redutor (a L-glutathione reduzida ou GSH) que cliva o grupo tiol S-S da biotina que restou na superfície celular (GABRIEL *et al.*, 2009). Portanto, as únicas proteínas biotiniladas que permanecem são aquelas que saíram da superfície no tempo t=0 e foram internalizadas, ficando protegidas da ação do agente redutor. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes com PBS²⁺ gelado pH 8,2 e foram lisadas com 100 µl de tampão de lise RIPA modificado sem SDS (50 mM Tris-HCl; 0,2% de deoxicolato de sódio; 1% Nonidet-40 (NP-40) e 150 mM de NaCl) gelado contendo inibidores de protease (Roche) por 30 minutos em banho de gelo.

Após a lise, foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a $16.000 \times g$ a 4°C . Os sobrenadantes foram coletados e submetidos à cromatografia de afinidade com $25 \mu\text{l}$ de resina *Novex Streptavidin-Agarose* (Life Technologies) por 2 horas ou de um dia para o outro por 16h, sob agitação em orbital a 4°C (Figura 11). Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens da resina com o mesmo tampão de lise. Em seguida, foi adicionado a cada amostra $40 \mu\text{l}$ de tampão de amostra 2,5 X redutor e as amostras foram então fervidas por 10 minutos a 95°C , desligando-se assim as proteínas da streptavidina. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação para baixar o sedimento de resina. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e resolvido através de SDS-PAGE.

FIGURA 11 – ESQUEMA DO ENSAIO DE BIOTINILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR.



FONTE: A autora, 2017, adaptado de GABRIEL *et al.*, 2009.

LEGENDA: Células foram biotiniladas a 4°C com 1 mM de biotina para marcar apenas proteínas de superfície, e depois incubadas com $0,1 \text{ M}$ de glicina para bloquear as biotinas livres. Em seguida, foram incubadas a 37°C para iniciar a internalização. Após a internalização, células foram rapidamente resfriadas em gelo para parar os processos endocíticos e a biotina residual da superfície é removida tratando-se as células com um forte agente redutor que cliva o grupo tiol S-S (L-glutathiona reduzida ou GSH) (*Stripping*). As únicas proteínas biotiniladas que permanecem são aquelas que saíram da superfície no tempo $t=0$ e foram internalizadas, sendo que ficaram protegidas da ação do agente redutor. As proteínas biotiniladas são

isoladas por cromatografia de afinidade (*pull-down*) com *beads* de streptavidina-agarose e a ADAM23 foi detectada por *western blotting*.

3.7. Purificação da ADAM23 recombinante (Dis-Cys)

Foi feita uma eletroporação com 2 µl do plasmídeo pET28-ADAM23(Dis-Cys)-6His (que contém a proteína ADAM23 fusionada a uma cauda com 6 resíduos de histidina), 40 µl de bactérias *E. coli* BL21STAR (DE). A eletroporação foi realizada em eletroporador *Gene Pulser Xcell Electroporation System* (Biorad). Após a eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio LB sem antibiótico para a recuperação e crescimento das bactérias. As bactérias foram incubadas sob agitação a 37°C durante 1 hora para crescer. Em seguida, o meio com bactérias foi submetido à centrifugação em microcentrífuga *Minispin Plus* (Eppendorf) por 2 minutos a 8.000 rpm. O sobrenadante e o sedimento (*pellet*) foram plaqueados separadamente, cada um em uma placa de Petri de 100 cm² contendo meio LB-ágar (Luria-broth-ágar) (triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l); ágar (15 g/l)) com canamicina (30 µg/ml), e incubados de um dia para o outro em estufa a 37°C.

O pré-inóculo foi feito com uma colônia inoculada em 20 ml de meio LB contendo antibiótico canamicina (30 µg/ml) e incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm por 15 horas. Em seguida, retirou-se 10 ml do pré-inóculo crescido e adicionou-se ao inóculo, contendo 500 ml de meio LB ((triptona (10 g/l); extrato de levedura (5 g/l); NaCl (10 g/l)) com canamicina (30 µg/ml), numa proporção de 1:100. O inóculo foi então incubado por 2 horas a 37°C sob agitação, e em seguida, foi mensurada a densidade óptica ($D_{O.600}$) em 1 ml de meio de cultura crescido do inóculo, para garantir que a mesma estaria entre 0,5 e 0,6. Em seguida, foi adicionado 1 mM de IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) para induzir a expressão e as bactérias foram incubadas por mais 3 horas a 37°C sob agitação. Em seguida, o meio de cultura crescido foi centrifugado a 5.000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento (*pellet*) foi ressuspensionado em 20 ml de tampão de lise nativo (50 mM NaH₂PO₄; 0,5 M NaCl; pH 8,0), com 1 mM do inibidor de protease PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) em banho de gelo. O sedimento (*pellet*) foi então lisado em prensa de French (*French Press*) a 1.000 psig.

Em seguida, o lisado foi submetido à centrifugação a 9.000 x g por 30 minutos a 4 °C, sendo o sobrenadante guardado em outro tubo e o sedimento (*pellet*) do lisado,

ressuspendido em 30 ml de tampão de lise desnaturante com guanidina (6 M de hidrocloreto de guanidina; 20 mM de NaH_2PO_4 ; 500 mM de NaCl; pH 7,8), um forte agente desnaturante que favorece a solubilização das proteínas. Em seguida, essa amostra foi submetida à lise mecânica através de seringa com agulha 13 mm x 0,30 mm 30G 1/2 (BD, Biosciences) por 40 minutos em banho de gelo. A amostra foi então submetida à centrifugação a $3.500 \times g$ por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi filtrado com um filtro de seringa estéril descartável de $0,45 \mu\text{M}$. A coluna de purificação (GE Healthcare) foi previamente lavada 3 vezes com água e pré-equilibrada com tampão de lise nativo e depois com tampão de lise desnaturante com guanidina. Em seguida, o sobrenadante filtrado foi ressuspendido em resina de níquel-agarose Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético) (QIAGEN), a ele foram adicionados 10 mM de imidazol e essa mistura foi então incubada em um orbital de homogeneização por 1 hora em temperatura ambiente.

O imidazol é adicionado antes da incubação para evitar ligações inespecíficas com a resina. O imidazol compete com a proteína do sobrenadante para se ligar à resina de Ni-NTA agarose. Ni-NTA é uma matriz de cromatografia por afinidade para purificação de proteínas recombinantes, purificadas a partir de *E.coli*, que possuem uma cauda de histidina com 6 ou mais resíduos de histidina (6His-tag), a qual se liga à resina na coluna. Os resíduos de histidina na cauda ou “tag” de histidina se ligam às posições vazias na esfera dos íons de níquel imobilizados com alta especificidade e afinidade. Os lisados celulares clareados são colocados na matriz da coluna, as proteínas com cauda de histidina se ligam ao níquel da resina e ficam retidas na coluna.

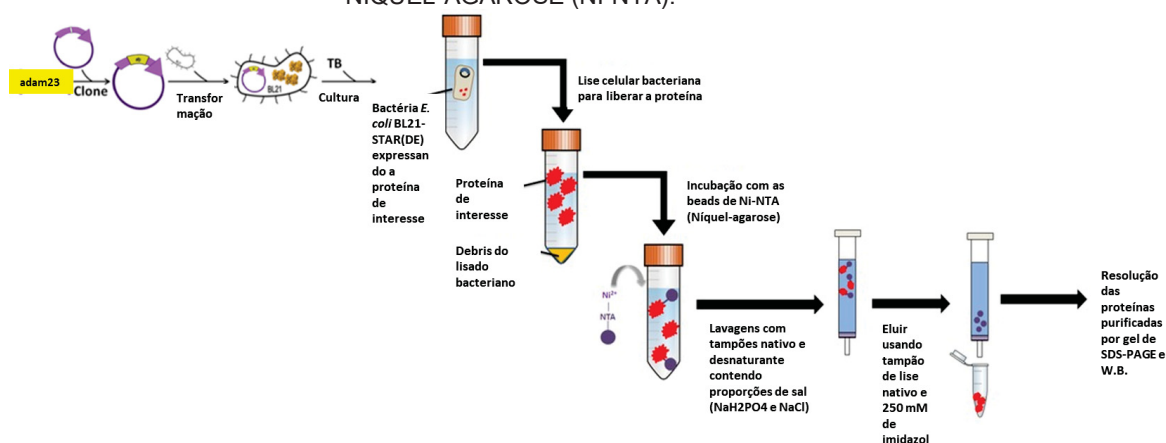
A passagem dos tampões na coluna de níquel foi de fluxo contínuo. Após as lavagens, as proteínas com cauda de histidina foram eluídas em tampões com condições nativas ou desnaturantes. Após a montagem da coluna da resina e a adição da mistura do sobrenadante, com resina e imidazol à coluna, todo o sobrenadante que passou pela coluna, caracterizando o *void*, foi coletado. Em seguida, a resina retida na coluna foi lavada 2 vezes, cada uma com 20 ml de tampão desnaturante de ligação à coluna (0,58 ml da solução A (200 mM de NaH_2PO_4 monobásico; 5 M de NaCl); 9,42 ml da solução B (200 mM de Na_2HPO_4 dibásico; 5 M de NaCl); 48,1 g de uréia e q.s.p. 100 ml de H_2O destilada).

A próxima lavagem foi com 20 ml do tampão 1 (1:2 do tampão desnaturante de lavagem com tampão nativo de lavagem). Em seguida, a resina foi lavada com 20 ml do tampão 2 (1:4 do tampão desnaturante de lavagem com tampão nativo de lavagem) e

com 20 ml do tampão 3 (1:8 do tampão desnaturante de lavagem com tampão nativo de lavagem), nessa ordem. O tampão desnaturante de lavagem contém (7,38 ml da solução A (200 mM de NaH_2PO_4 monobásico; 5 M de NaCl); 2,52 ml da solução B (200 mM de Na_2HPO_4 dibásico; 5 M de NaCl); 48,1 g de uréia e q.s.p. 100 ml de H_2O destilada). Em seguida, a resina foi lavada 2 vezes, cada uma com 20 ml do tampão nativo de lavagem (50 mM NaH_2PO_4 ; 0,5 M NaCl ; 40 mM Imidazol). Cada uma dessas lavagens com cada um desses tampões foi coletada.

Em seguida, foi realizada a eluição da proteína com 20 ml do tampão nativo de eluição (10 ml do tampão de lise nativo com 250 mM Imidazol). A partir dessa eluição foram coletadas 10 frações na ordem em que foram eluídas. As lavagens e os eluatos foram misturados com tampão de amostra 5x redutor, desnaturados a 95°C por 7 minutos e submetidos a uma eletroforese em SDS-PAGE, em gel de acrilamida 15%. Em seguida, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie. Em seguida, os eluatos foram mensurados com relação à absorbância em 280 nm, combinados entre os mais concentrados e submetidos à diálise contra PBS 1X, com três trocas de PBS 1X, para remover a uréia das amostras que haviam sido purificadas com tampão que continha uréia. Após a diálise, os eluatos unificados tiveram de novo sua absorbância mensurada e foram analisados por eletroforese por SDS-PAGE em gel de acrilamida 15%. Em seguida, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie. O resumo dessa etapa está representado na Figura 12.

FIGURA 12 – ETAPAS DA PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE À RESINA DE NÍQUEL-AGAROSE (NI-NTA).



FONTE: A autora, 2018.

LEGENDA: Após a clonagem com pET28-ADAM23(Dis-Cys)-6His e expressão de ADAM23(Dis-Cys)-6His em *E. coli* BL21STAR (DE), as bactérias foram lisadas, centrifugadas e o sobrenadante contendo

a proteína foi incubado com a resina de níquel-agarose (Ni-NTA) que tem afinidade pela cauda de 6 histidinas da ADAM23. Após a ligação, a resina foi lavada com tampões desnaturantes contendo proporções de sais (NaH_2PO_4 e NaCl). Após as lavagens, a proteína recombinante ADAM23(Dis-Cys)-6His foi eluída da coluna com tampão de lise nativo acrescido de 250 mM de imidazol. As proteínas purificadas foram então avaliadas por SDS-PAGE e *western blot*.

3.8. Purificação de monoclonal anti-ADAM23 por cromatografia de afinidade à resina CNBr-ADAM23(Dis-Cys).

A purificação dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 (derivados do sobrenadante do hibridoma DL11C8 produzido previamente em nosso laboratório) foi feita por cromatografia de afinidade à resina de brometo de cianogênio (CNBr) conjugada com a ADAM23 recombinante (Dis-Cys). Primeiramente todas as frações/eluatados resultantes da purificação da ADAM23 recombinante com coluna de resina de Níquel-agarose foram somados e dialisados contra o tampão de ligação ou *coupling buffer* (0,1 M NaHCO_3 ; 0,5 M NaCl ; pH 8,3) e, aproximadamente 3 mg de proteína recombinante foram incubados com a coluna de brometo de cianogênio CNBr-activated SepharoseTM 4B (GE, Healthcare, Uppsala, Suécia), segundo o manual do fabricante. Antes e depois da incubação da ADAM23 recombinante com a resina de CNBr, as absorbâncias foram mensuradas a 280 nm, para garantir que quase toda a recombinante havia sido ligada às beads de CNBr.

Após a montagem da coluna CNBr-ADAM23(Dis-Cys), a mesma foi pré-equilibrada com 50 ml tampão Tris 50 mM pH 7,0 e, em seguida, aproximadamente 150 ml de sobrenadante de meio de cultura de hibridoma DL11C8 contendo monoclonais anti-ADAM23 foram incubados com a resina. Assim, os anticorpos ficaram retidos na resina da coluna e o sobrenadante passou para baixo. Em seguida, a resina foi novamente lavada com 50 ml de Tris 50 mM pH 7,80 e, então, a IgG eluída com 25 ml de uma solução de glicina 0,1 M pH 2,5 (preparada antes do uso) que apresenta baixo pH para desfazer a ligação dos anticorpos IgG à resina. Em cada tubo de 1,5 ml onde foram coletadas as frações da eluição (1 ml por tubo), foram previamente adicionados 100 μl de uma solução de Tris 1 M pH 9,0, necessária para neutralizar o pH e evitar a degradação das IgGs.

Após a eluição, as frações que continham IgG foram unificadas e dialisadas contra PBS 0,1X. Em seguida, a concentração de IgG foi estimada por leitura da absorbância em 280 nm em um espectrofotômetro *Hitachi U-2900 spectrophotometer* (HITACHI) com cubetas de quartzo. Com os valores de absorbância obtidos, pôde-se calcular a

concentração dos anticorpos em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dividindo-se o valor da absorbância por 1,4 (constante para moléculas tipo IgG). A reatividade desses monoclonais anti-ADAM23 purificados foi testada e confirmada por ELISA e SDS-PAGE.

3.9. Ensaio imunoenzimático (ELISA) das IgGs purificadas

A análise das frações de IgGs anti-ADAM23 purificadas foi feita através do ensaio imunoenzimático ELISA, sendo importante ressaltar que os monoclonais anti-ADAM23 se ligam aos domínios desintegrina e cisteína da ADAM23. Para o ensaio de ELISA, foi feita a imobilização de 0,5 μg de ADAM23 recombinante (Dis-Cys), expressa em bactéria e diluída em tampão carbonato (100 mM, pH 9,6), adicionando-se 50 μl dessa solução por poço de 0,3 cm^2 em placa modulável do tipo Maxisorp. Como os anticorpos podem se ligar ao plástico dos poços e não necessariamente apenas ao antígeno, foi feito então o bloqueio dos sítios não ocupados pelo antígeno, com 300 μl /poço de solução de bloqueio PBS-BSA 1% (p/v) (PBS com 1% de albumina bovina (BSA)) por duas horas a 37°C. Os anticorpos primários consistiram nas frações/eluatados dos monoclonais anti-ADAM23 do sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 purificados por coluna de CNBr-ADAM23(Dis-Cys) e já dialisados contra PBS 0,1X.

Do anticorpo anti-ADAM23, para a fração 1, frações 2-4 e frações 3-4 foram utilizadas as seguintes concentrações: puro; 1:3.000 e 1:800 em PBS-BSA 0,1% (p/v) (PBS com 0,1% de BSA, albumina bovina), sendo que foram sempre utilizados 100 μl /poço. Como controle negativo foram feitos o branco (poços com a ADAM23(Dis-Cys) adsorvida sem incubação dos anticorpos primários e secundários), o controle do secundário (poços com a recombinante, sem o anti-ADAM23 primário e incubados com o secundário 1:4.000) e o controle com IgG de camundongo irrelevante (a IgG irrelevante foi incubada como primário nas mesmas concentrações dos monoclonais anti-ADAM23 (1:3.000 e 1:800) e nesse controle foi adicionado o secundário 1:4.000).

Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante de cultura de hibridoma DL11C8 em 100 μl /poço, puro, sem diluição. Após a adição desses anticorpos primários, foi feita uma incubação de duas horas em estufa a 37 °C. Os poços foram então lavados em três ciclos com PBS acrescido de 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST 0,05%), e foram então adicionados 100 μl por poço de anticorpo secundário contra imunoglobulina de

camundongo conjugado com HRP (Sigma) diluído 1:4.000 em solução de PBS-BSA 0,1%. Após incubação de uma hora a 37 °C, outros três ciclos de lavagens foram feitos.

Em seguida, a reação foi revelada adicionando-se 100 µl/poço de solução de revelação TMB (Life Technologies), sendo incubada em câmara escura por 15 minutos. Após a revelação, a reação foi bloqueada através da adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1 M (1 M H₂SO₄). A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de placas com filtro para comprimento de onda a 450 nm (Bio-Tek).

3.10. Imunoprecipitação do monoclonal anti-ADAM23 purificado pela resina de CNBr-ADAM23(Dis-Cys) por proteína A/G Sepharose.

Após a purificação dos monoclonais por CNBr-ADAM23(Dis-Cys), esses anticorpos foram submetidos a uma imunoprecipitação por proteína A/G Sepharose, com o objetivo de testar a eficiência desse método na concentração e enriquecimento da ADAM23 que se liga a esses monoclonais do tipo IgG.

Extrato de encéfalo murino foi lisado com tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,2% de deoxicolato de sódio; 0,5% de Triton X-100, com coquetel de inibidores de proteases) por 30 min no gelo e centrifugados por 15 min a 10.000 x g a 4°C. Os lisados (1 mg) foram incubados com aproximadamente 1 µg de monoclonal anti-ADAM23 purificado e de IgG irrelevante (controle negativo da reação), depois foram separadamente misturados com quantidades iguais de resina A/G Sepharose e, incubados por 14 horas a 4°C. A ligação dos anticorpos com a resina (*cross-linking*) foi feita com agente cross-ligante químico, DMP (dimethyl pimelimidate) (Thermo Scientific), conforme manual do fabricante. As *beads* de resina foram lavadas com tampão de lise, em seguida, as proteínas que estavam ligadas foram eluídas com tampão de amostra (*Laemmli Buffer*) e analisadas por SDS-PAGE.

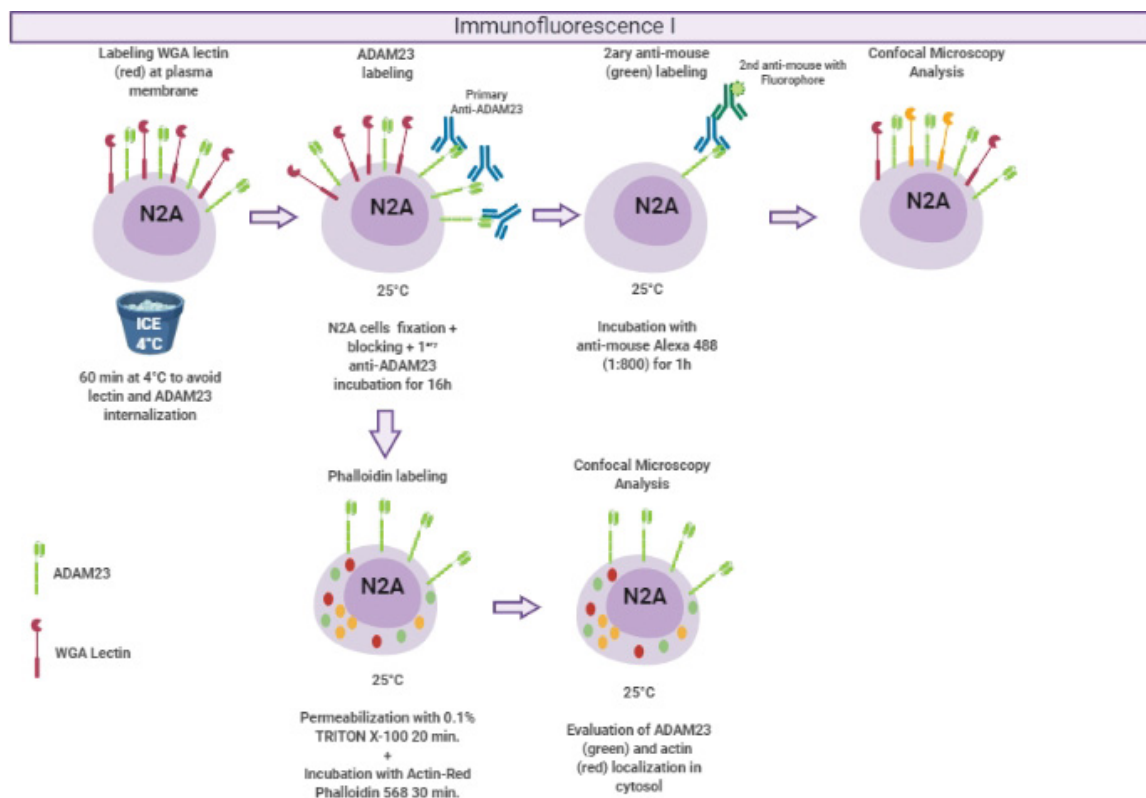
3.11. Imunofluorescência I

A marcação de células Neuro-2a com a proteína aglutinina do germe de trigo conjugada com Alexa Fluor 594 (WGA-Alexa; 1:300; Invitrogen), que marca em vermelho a membrana, foi feita seguindo as instruções do fabricante, sendo utilizada na visualização da co-localização de ADAM23 com polissacarídeos da membrana

plasmática. As células N2A foram separadas em 5×10^4 por poço/condição, plaqueadas e marcadas. Essas células foram fixadas com 2% de PFA em PBS por 20 minutos a T.A. e então bloqueadas com 0,1 M de glicina em PBS por 5 min. Na marcação com WGA as células não foram permeabilizadas e foram bloqueadas com 1% de BSA em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com sobrenadante de hibridoma concentrado 12,5x com Amicon contendo os anticorpos primários contra a ADAM23 por 16 horas a 4°C. As células foram lavadas com PBS entre cada etapa. Para a marcação dos anticorpos primários (monoclonais anti-ADAM23) foram utilizados anticorpos secundários anti-IgG de camundongo (anti-mouse) conjugados com Alexa 488 (1:500; Invitrogen), que marcam em verde, diluídos em PBS e reagidos por 40 minutos em temperatura ambiente. Os núcleos foram marcados com uma incubação de 30 minutos com solução de DAPI (Invitrogen; 100 µ/ml (1:1.000)) em PBS.

Outro grupo de células N2A também foi marcado com uma solução contendo phalloidina conjugada com Alexa Fluor 594 (Actin-red; Invitrogen) diluída em PBS, de acordo com o protocolo do fabricante (1 gota para cada 2 ml), para visualizar a distribuição da ADAM23 no citoplasma. As células foram submetidas às mesmas etapas iniciais da marcação com WGA. Entretanto, nesse caso, após a incubação do secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (1:500; Invitrogen), a ligação anticorpo primário-secundário foi estabilizada com 0,5% de PFA. Apenas após essa estabilização, as células foram permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS e então marcadas com phalloidina diluída em 0,1% de Triton X-100 em PBS como descrito acima. A marcação de núcleo com DAPI foi feita junto com a phalloidina na mesma solução por 30 minutos (Figura 13).

FIGURA 13 – ESQUEMA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA I.



FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Na primeira etapa, para ver a ADAM23 na membrana plasmática, as células N2A foram incubadas previamente a 4°C por 15 min. para parar a internalização e incubadas por 60 min com WGA (568 nm) também a 4°C. Em seguida, as células foram fixadas com PFA 2%, bloqueadas com glicina, permeabilizadas com Triton x-100 e incubadas com anti-ADAM23 (DL11C8) por 16h. A reação foi feita com secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 nm (1:500). Na segunda etapa, para ver a ADAM23 no citoplasma, as N2A foram diretamente fixadas, permeabilizadas e incubadas com anti-ADAM23 (DL11C8) por 16 h. Em seguida, as células foram incubadas com Actin-Red Phalloidina 568 nm por 30 min. em temperatura ambiente para marcar o citoplasma.

3.12. Imunofluorescência II

Células N2A foram transfectadas com pCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene), contendo a sequência humana completa *full-length* de ADAM23, em suspensão (1 ug/poço de DNA e 2 ul/poço de Lipofectamina 2000, Invitrogen em meio OptiMEM) e plaquetas 5×10^5 células por lamínula, por poço. Após 48 h, as células foram incubadas por 15 min. a 4°C para parar a internalização. Em seguida, foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-ADAM23 12,5X concentrado a partir do sobrenadante do

hibridoma DL11C8 em Amicon (Merck-Millipore) com corte “*cut-off*” de 10 kDa (500 ul/poço) por 2 h a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e fixadas com PFA 2% em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS.

O primeiro bloqueio foi feito com Glicina 0,1 M em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, as células foram lavadas com PBS 3 vezes e foi feito outro bloqueio junto com permeabilização com solução de BSA 1% em PBS-Triton X-100 0,1% por 30 minutos também em temperatura ambiente. Em seguida, foram incubados os anticorpos: anti-EEA1 (1:50, Cell Signaling Technology, #C45B10), anti-Rab4 (1:50, Abcam, #ab13252), anti-Rab5 (1:50, Cell Signaling Technology, #C8B1), anti-Rab7 (1:50, Cell Signaling Technology, #D95F2) ou anti-Rab11 (1:25, Cell Signaling Technology, #D4F5).

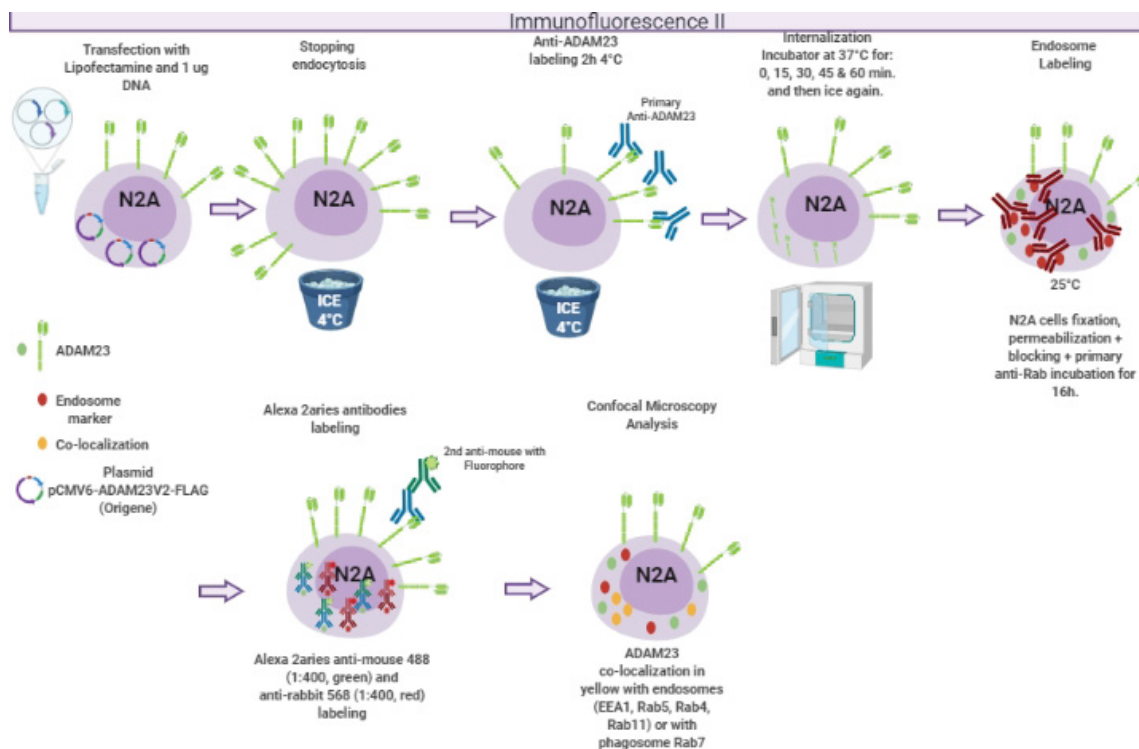
Para marcação de lisossomo foi usado um anticorpo monoclonal de coelho: anti-LAMP1 (1:50, Cell Signaling Technology, #D2D11) diluídos em PBS-BSA 1%, de um dia para o outro por 16 h, em câmara úmida a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-Triton 0,1%. As células foram incubadas com os anticorpos secundários diluídos em PBS-BSA 1%, anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (Life Technologies, 1:400) em verde e anti-IgG de coelho (anti-rabbit) Alexa 568 (Life Technologies, 1:400) em vermelho (Figura 14).

Após a incubação dos anticorpos secundários, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-Triton 0,1% e as ligações dos anticorpos primários e secundários foram fixadas com 0,5% PFA em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente. Logo após, as células foram lavadas três vezes com PBS-Triton 0,1% e as lamínulas foram montadas nas lâminas com DAPI (1 ug/ul) em glicerol 50%.

A captura de imagens foi realizada em microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 60X, imersas em óleo (com abertura numérica de 1.45), com zoom de 1,5X. Para o anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (contra o anti-ADAM23) de cor verde foi utilizado laser 488 para excitação e filtro de intervalo (“band pass”) de 500-550 nm. Para o anti-IgG de coelho (anti-rabbit) Alexa 568 (contra os anticorpos anti-Rab4 ou anti-Rab11) de cor vermelha foi utilizado o laser de excitação 570-620 nm e para o DAPI foi utilizado laser 405 para excitação e filtro de intervalo (“band pass”) de 425 - 475 nm. O programa Imaging Software Nis Elements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan) foi utilizado para a visualização das imagens e das fatias

ópticas (Z slices). As imagens foram escolhidas com base nos cortes (Z slices) de 7 a 13 (Z=7 a Z=13).

FIGURA 14 – ESQUEMA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA II.



FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A foram transfectadas com o vetor pCMV6-ADAM23-FLAG contendo a sequência *full-length* da ADAM23 murina. Após 48 h de expressão, as células foram incubadas por 15 min. a 4°C para parar a internalização da ADAM23. Em seguida, foram marcadas com anti-ADAM23 (DL11C8) a 4°C por 2 h e então incubadas na estufa a 37°C para induzir a internalização pelos tempos: 0, 15, 30, 45 e 60 min. Em seguida, as células foram fixadas com PFA 2%, bloqueadas com glicina 0,1 M e permeabilizadas e bloqueadas com Triton x-100-BSA 1%. A reação primária do marcador de endossomo foi feita com anti-EEA1 (1:50), anti-Rab5 (1:50), anti-Rab4 (1:50), anti-Rab 11 (1:25) ou anti-Rab7 (1:50) por 16 h a 4°C. A reação secundária foi feita com anticorpos anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 nm (1:400) e anti-IgG de coelho (anti-rabbit) 568 nm (1:400). As imagens de co-localização foram feitas no microscópio confocal *Nikon A1RSiMP* (NIKON, Tokyo, Japan), utilizando objetivas de 60X, imersas em óleo (com abertura numérica de 1.45), com zoom de 1,5X.

3.13. Ensaio do bloqueio da endocitose de ADAM23

Com o objetivo de avaliar a inibição da endocitose de ADAM23, células N2A transfectadas com pCMV6-ADAM23-V2-FLAG foram tratadas com 2,5 μ M de metil-beta ciclodextrina (M β CD, Sigma), um inibidor genérico da endocitose (inibe via da clatrina e caveossomo). Esse inibidor foi escolhido com base nos achados de STAUTZ e colaboradores (2012) envolvendo a internalização de ADAM12 por clatrina e sua inibição com aquele inibidor. O ensaio empregou células tratadas ou não com o inibidor e ensaios de marcação e rastreamento ou “pulso-caça” de proteínas biotiniladas e internalizadas.

O tempo máximo de internalização avaliado foi de 30 min, levando em consideração o tempo de internalização da ADAM12 por clatrina em até 30 min. (STAUTZ *et al.*, 2012). Foram feitos os controles: total biotinilado sem remoção com GSH, ou seja, sem *stripping* (TB, controle positivo) e o controle negativo da internalização a 4°C. Após esses tempos, os extratos celulares foram incubados com streptavidina-agarose. Após a precipitação (*pulldown*) com avidina as amostras foram analisadas por *western blot*.

3.14. Ensaios de estabilidade da ADAM23

Com o objetivo de bloquear a síntese protéica e acompanhar a degradação de ADAM23 ao longo do tempo foi feito um tratamento com 10 μ M de inibidor da síntese protéica cycloheximide (CHX, Sigma) por 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 e 16h em células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG).

Além disso, objetivando avaliar a meia-vida e a duração da ADAM23 na membrana plasmática foi feito um ensaio de biotinilação em células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG). As células N2A foram biotiniladas com biotina sem grupo tiol SS *EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin* (Pierce, Thermo Scientific) e incubadas para que ocorresse a endocitose a 37°C por: 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h. Após esses tempos, foi feita a lise, sendo que 15 μ g de cada extrato foram incubados com a mesma resina Novex streptavidin-agarose (Thermo Scientific) descrita nos itens anteriores. Foram feitos controles da quantidade de massa de proteína aplicada (*inputs*) com 15 μ g de proteína de cada extrato antes da incubação com streptavidina-agarose.

Também foi feito um ensaio de estabilidade de ADAM23 por imunofluorescência com células N2A transfectadas com ADAM23 murina. Sendo este ensaio complementar ao de biotinylation e *western blot*. As células foram marcadas primeiramente com anti-ADAM23 por 2 h a 4°C ao invés de biotina. A partir disso, as células foram incubadas na estufa a 37°C por: 0, 24, 48 e 72 h para acompanhar o decaimento da quantidade de ADAM23 na membrana e no citoplasma (ADAM23 que foi internalizada). Reações de imunofluorescência foram feitas com anti-ADAM23 (sobrenadante DL11C8) e anti-IgG de camundongo Alexa 488 (1:400). Núcleos foram marcados com DAPI (1 µg/µl).

3.15. Ensaios de *Western Blotting*

Nos ensaios de SDS-PAGE foram utilizados géis de acrilamida 10%. Em geral, foram utilizadas massas variadas de extratos de células enriquecidos ou não com a concanavalina A-sepharose. O tampão de amostra com azul de bromofenol 2,5X redutor contendo β-mercaptoetanol (*laemmli buffer*) foi adicionado às amostras que sofreram desnaturação entre 95 e 100°C por 5 a 10 minutos. A eletroforese foi realizada entre 20-30 mA em tanque com tampão de corrida ou “*running buffer*” (25 mM Tris; 190 mM glicina e 0,1% de SDS).

A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) foi realizada a 100 volts, com miliamperagem máxima de 300 mA, por 2 horas em tanque de transferência com tampão de transferência ou “*transfer buffer*” (48 mM de trisbase; 39 mM de glicina; 0,037% (p/v) de SDS; 20% de metanol (v/v); pH 8,3) gelado em banho de gelo, sob agitação magnética. As proteínas na membrana foram identificadas pela coloração com Ponceau 0,2% e as membranas bloqueadas com solução de TBST-BSA 1% (200 mM de Tris-HCl (pH 7,5); 1,5 M NaCl; 0,05% de Tween-20 e 1% BSA (albumina bovina)) por 1 hora em temperatura ambiente.

Para a identificação da ADAM23 foram utilizados o sobrenadante não-purificado de hibridoma DL11C8. Os anticorpos foram diluídos em solução de TBST-BSA 0,1%. A incubação com o anticorpo primário (SN DL11C8 ou com anti-cadeia pesada de clatrina 1:4.000) ocorreu por até 16 horas sob agitação a 4°C. As membranas foram lavadas sob agitação com TBST 0,05% 3 vezes de 5 minutos.

Os anticorpos secundários utilizados foram os conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*) anti-IgG de camundongo (anti-mouse, 1:10.000) ou anti-IgG de coelho (anti-

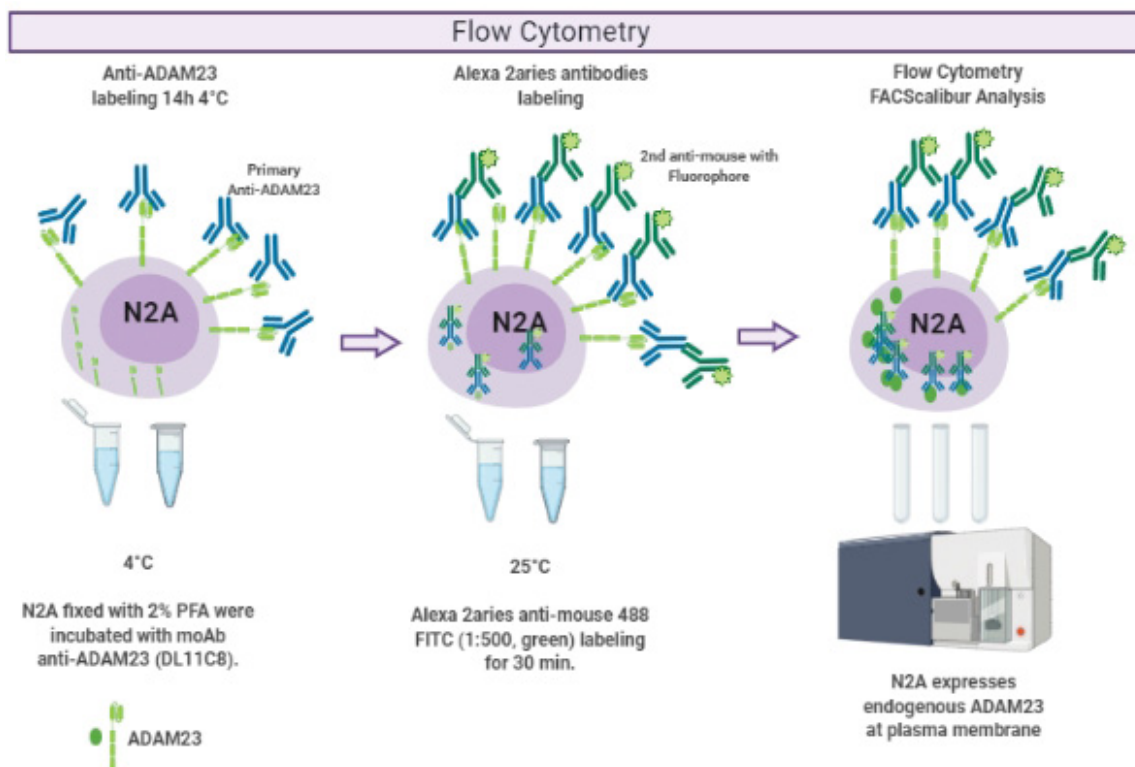
rabbit, 1:5000). A incubação ocorreu por 1 hora sob agitação em gangorra em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas sob agitação com TBST 0,05% 3 vezes de 5 minutos.

A revelação foi feita com o substrato para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit *West Pico* (Thermo Scientific) ou o kit mais sensível *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific). Filmes de auto-radiograma não-sensível *Carestream* (Kodak) e sensível *Amersham HyperfilmTM ECL* (GE Healthcare) foram expostos a cada membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

3.16. Citometria de Fluxo

Com o objetivo de testar a reatividade do monoclonal anti-ADAM23 com a ADAM23 endógena, as células N2A (1×10^6 células por condição) não transfectadas foram fixadas com PFA 2% e incubadas com anticorpos monoclonais DL11C8 (anti-ADAM23) ou controles apropriados paralelos por 14 h a 4°C. Após várias lavagens com PBS, as células foram incubadas com anti-IgG de camundongo (anti-mouse) conjugado com FITC Alexa 488 nm (1:500, Sigma) por 30 min. a temperatura ambiente, lavadas novamente e analisadas no citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD Biosciences) (Figura 15).

FIGURA 15 – ESQUEMA DA CITOMETRIA DE FLUXO.



FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A não-transfectadas foram fixadas e incubadas por 16 h com moAb anti-ADAM23 (SN de hibridoma DL11C8), sendo os controles negativos incubados com o mesmo meio RPMI do hibridoma DL11C8 sem anti-ADAM23. A reação secundária foi feita com anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (1:500) por 30 min. Foram feitas várias lavagens e as células marcadas foram analisadas no citômetro *FACSCalibur*.

4. RESULTADOS

4.1. Enriquecimento das formas da ADAM23 em linhagens celulares de câncer de mama 435, 435-1C e neuronal SHSY-5Y.

Com os objetivos de complementar outros ensaios do grupo a respeito do enriquecimento das formas de ADAM23 endogenamente expressadas na linhagem celular de câncer de mama MDA-MB 435 foi feito um ensaio de enriquecimento em glicoproteínas por cromatografia de afinidade à concanavalina A-Sepharose. Como controle negativo foi utilizada a linhagem MDA-MB 435-1C (cuja expressão de ADAM23 foi silenciada com RNAi) (COSTA *et al.*, 2003).

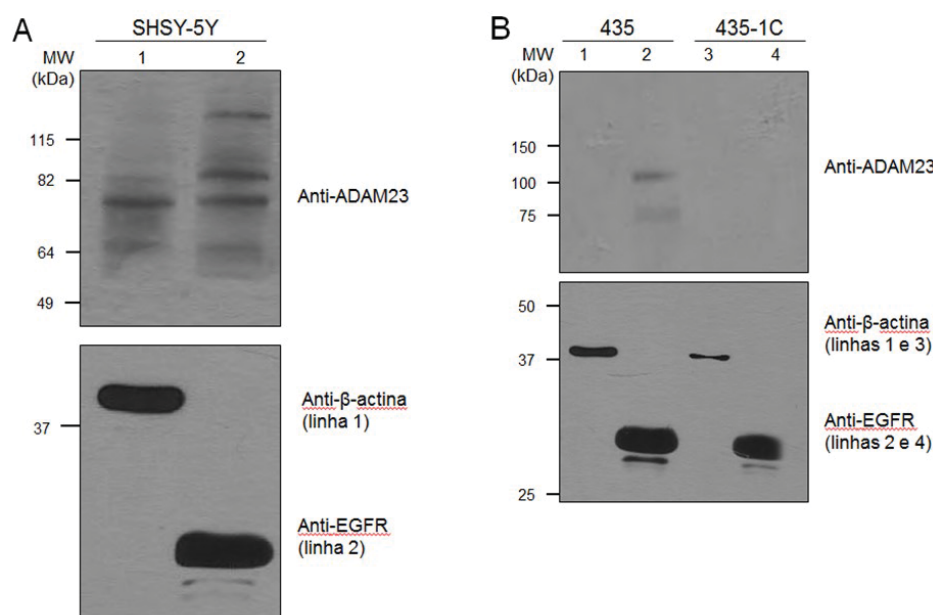
Foi possível confirmar a presença das formas de 100 kDa e 70 kDa de ADAM23 no extrato celular de 435 com enriquecimento por conA (Figura 16B, linha 2). A presença de mRNAs de ADAM23 foi inicialmente caracterizada pelo nosso grupo nas linhagens de mama MDA-MB-436 (COSTA *et al.*, 2003) e MDA-MB-435 (VERBISCK *et al.*, 2009), além disso, o uso de anticorpos específicos anti-ADAM23 permitiu a avaliação direta da expressão desta proteína através de *western blotting* segundo Costa e colaboradores (2003). Assim, os extratos de diferentes linhagens celulares foram submetidas à reação com o anticorpo anti-ADAM23 (Figura 16).

Antes da imunoreação, as amostras foram enriquecidas em glicoproteínas através de afinidade por concanavalina A-Sepharose, uma vez que este procedimento mostrou-se adequado na identificação de outras ADAMs com baixa abundância relativa (KRATZSCHMAR *et al.*, 1996; GOLDSMITH *et al.*, 2004; SCHAFER *et al.*, 2004). Ambas as linhagens SHSY-5Y e MDA-MB 435 apresentaram positividade para a forma de 100 kDa de ADAM23 (Figura 16A, linhas 1 e 2; Figura 16B, linha 2). A presença das formas de 100 kDa e 70 kDa reconhecida pelo anti-ADAM23 na linhagem MDA-MB 435 sugere que essa linhagem expressa ambas as formas de ADAM23. Interessantemente, na linhagem 435 a forma de 100 kDa só foi observada quando a amostra foi enriquecida em glicoproteínas por afinidade à concanavalina-A (Figura 16B, linha 2).

Já a linhagem de neuroblastomas humano SHSY-5Y enriquecida ou não em glicoproteínas por conA, foi possível detectar ambas as formas de 100 e 70 kDa da ADAM23, sendo a forma de 100 kDa mais intensa quando enriquecida por conA (Figura 16A, linhas 2 e 3). Isso pode ser devido ao fato de a forma não-processada da ADAM23

apresentar maior número de sítios glicosilados, e com isso, possuir maior afinidade pela concanavalina A-Sepharose do que a forma processada de 70 kDa, que no processamento por proteases perde alguns desses sítios. As amostras enriquecidas com conA foram submetidas à reação com o anticorpo anti-EGFR (receptor de fator de crescimento epidermal-EGF) (1:500), que se liga às glicosilações da proteína, confirmando que a proteína glicosilada é realmente enriquecida com concanavalina A-sepharose, que também tem afinidade pelas glicosilações de glicoproteínas como a ADAM23.

FIGURA 16 – FORMAS DA ADAM23 EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA 435, 435-1C E NEURONAL SHSY-5Y.



FONTE: A autora, 2016.

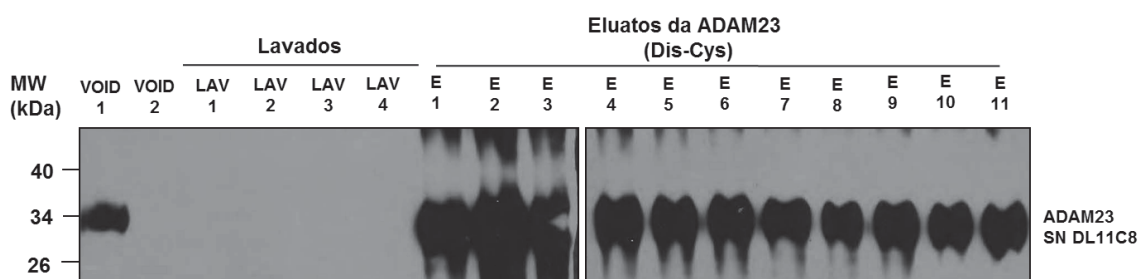
LEGENDA: MW: peso molecular (*molecular weight*). **A)** Formas de ADAM23 em extratos de células de neuroblastoma humano SHSY-5Y enriquecidos (linha 2) ou não (linha 1) com concanavalina A-sepharose. **B)** Formas de ADAM23 em extratos de células de câncer de mama 435 (linhas 1 e 2) e 435-1C (RNAi para ADAM23) (linhas 3 e 4) enriquecidas (linhas 2 e 4) ou não com conA (linhas 1 e 3). Em todos os casos foram utilizados 100 µg de extratos celulares reagidos com anticorpo primário anti-ADAM23 (SN de DL11C8) e o secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) HRP (Sigma) (1:3.000). Os extratos não-enriquecidos com conA foram reagidos também com β-actina (1:10.000) e os enriquecidos com conA, reagidos com anti-EGFR (1:500) que se liga às glicosilações da proteína.

4.2. Purificação da ADAM23 recombinante (Dis-Cys).

Foi feita uma purificação com coluna de níquel-agarose (Ni-NTA, Invitrogen), a partir de lisado de bactéria *E.coli* BL21STAR(DE) transformada com o vetor de expressão em bactéria, pET28-ADAM23(Dis-Cys)-6His, expressando a ADAM23 recombinante, que possui apenas os domínios desintegrina-cisteína (Dis-Cys) ligados a uma cauda/etiqueta ou “tag” de 6 histidinas que têm afinidade ao níquel. Essa purificação foi realizada com o objetivo de obter grandes quantidades dessa proteína para ligá-la a uma resina (sepharose) através do grupo químico brometo de cianogênio (CNBr). Esta matriz cromatográfica ADAM23(Dis-Cys)-sepharose foi utilizada na purificação dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 a partir do sobrenadante da cultura do hibridoma DL11C8.

Após a combinação das frações/eluatots e diálise contra PBS para a remoção do agente caotrópico desnaturante (uréia) a proteína recombinante permaneceu em solução e com padrão eletroforético de migração compatível com a massa molecular esperada de aproximadamente 28 kDa (Figura 17). A análise das frações contendo as proteínas não ligadas na coluna Ni-NTA-Agarose (Figura 17, linhas VOID1 e VOID2), as frações contendo diferentes condições de lavagem (Figura 17, linhas LAV1-5) e uma alíquota da matriz cromatográfica (fase estacionária, dado não mostrado) indicam que as proteínas que não possuíam a etiqueta de histidina não interagiram fortemente com a fase estacionária e foram adequadamente removidas pelas lavagens. As frações de interesse contendo os eluatots da ADAM23 (Figura 17, linhas E1-20) foram purificadas satisfatoriamente.

FIGURA 17 – PURIFICAÇÃO DA ADAM23 RECOMBINANTE (DIS-CYS)



FONTE: A autora, 2018.

LEGENDA: **MW**: peso molecular (*molecular weight*). **VOID1 e VOID2**: primeiro e segundo volumes de sobrenadante da resina de níquel-agarose que foram coletados. **LAV**: lavados que saíram da resina com tampão desnaturante de ligação à coluna (1), com tampão 1 (2), com tampão 2 (3), com tampão 3 (4), com

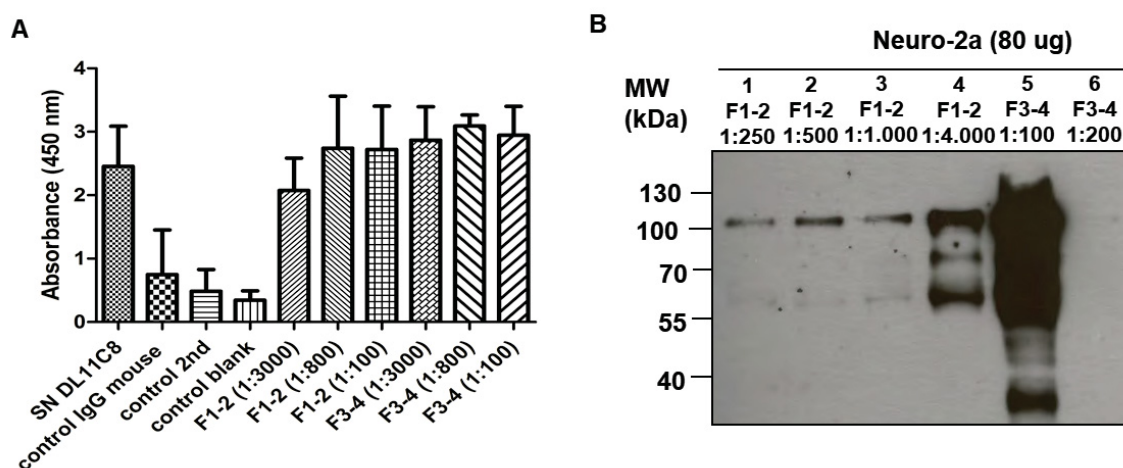
tampão nativo de lavagem (5). **E1-20:** frações/eluatados de 1 a 20 da ADAM23 recombinante (Dis-Cys) de aproximadamente 28 kDa.

4.3. Purificação de monoclonal anti-ADAM23 por cromatografia de afinidade à resina CNBr-ADAM23(Dis-Cys)-sepharose.

Com o objetivo de garantir uma purificação apenas dos anticorpos monoclonais específicos para a ADAM23 foi feita uma purificação por cromatografia de afinidade com a matriz cromatográfica de brometo de cianogênio acoplada com ADAM23 recombinante (Dis-Cys) e sepharose (CNBr-ADAM23(Dis-Cys)-sepharose). Diversos lotes de sobrenadantes de cultura foram combinados e cromatografados na coluna ADAM23(Dis-Cys)-sepharose.

Diferentes frações coletadas foram analisadas para a presença de anticorpos monoclonais reativos para o antígeno recombinante através de ELISA (Figura 18A) ou para ADAM23 expressa no encéfalo de camundongos por meio de *western blotting* (Figura 18B).

FIGURA 18 – RESULTADO DA PURIFICAÇÃO DO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 POR CROMATOGRAPHIA DE AFINIDADE À RESINA CNBR-ADAM23(DIS-CYS)..



FONTE: A autora, 2018.

LEGENDA: **(A)** ELISA das frações do anticorpo anti-ADAM23 purificado. As frações dialisadas dos anticorpos monoclonais anti-ADAM23 obtidas a partir de duas purificações diferentes (Frações F1-2, F3-4) foram reagidas contra 0,5 ug da proteína ADAM23 recombinante (Dis-Cys) em várias diluições. Foram utilizados controles positivo com sobrenadante de hibridoma DL11C8 contendo anticorpos anti-ADAM23 (SN DL11C8) e negativos com IgG de camundongo irrelevante (*control IgG mouse*), o controle contendo

apenas o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) HRP (*control 2nd*, 1:4.000) e o controle em branco (*control blank*) sem a proteína ADAM23 recombinante adsorvida na placa. Para a mistura das frações 1-2 foram testadas as concentrações 1:250; 1:500; 1:1.100 e 1:4.000. Para a mistura das frações 3-4 foram testadas as concentrações 1:100 e 1:200. **(B)** Western blot do teste das concentrações do anti-ADAM23 das frações 1 e 2 somadas e das frações 3 e 4 somadas após a diálise contra PBS 0,1X em extratos de células N2A (linhas 1-8, 80 ug cada).

4.4. Produção de matriz cromatográfica anti-ADAM23-sepharose e seu uso em ensaios de imunoprecipitação.

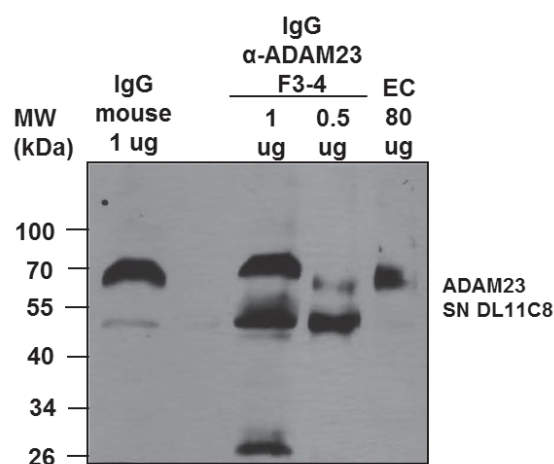
Ensaio de imunoprecipitação são corriqueiramente utilizados para o isolamento de proteínas de interesse a partir de misturas complexas ou utilizadas em ensaios de interação proteica (co-imunoprecipitação) na identificação de parceiros moleculares. O acoplamento covalente de anticorpos à uma matriz cromatográfica tem como vantagem a imobilização permanente do anticorpo o qual deixa de ser eluído nas etapas subsequentes da análise da interação proteína-proteína. A imobilização de anticorpos em resinas contendo o grupo CNBr (como aquela empregada no item 3.8.) tem como principal vantagem o método de acoplamento químico em apenas uma etapa, após ativação do grupo CNBr em pH alcalino.

Por outro lado, este método não permite o direcionamento funcional do anticorpo, uma vez que a reação química com a resina se dá em sítios aleatórios da biomolécula, com possível modificação estrutural do anticorpo e inativação da região de ligação a antígenos (porção Fab do anticorpo). Assim, optou-se pelo uso da resina proteína A/G-sepharose, a qual tem afinidade pela porção Fc de imunoglobulinas e mantém a porção Fab livre para interação com o antígeno de interesse. A estabilização permanente do anticorpo nesta matriz cromatográfica é obtida sequencialmente através de reação da resina com agente cross-ligante químico, DMP (dimethyl pimelimidate), muito utilizado em reações de ligação resina-proteína ou resina-anticorpo “*cross-link*”.

ADAM23 presente no extrato de encéfalo foi então imunoprecipitada com esta resina e as proteínas eluídas da matriz cromatográfica analisadas por *western blotting* com o monoclonal DL11C8 (Figura 19). Aparentemente parte das IgGs se desprenderam da resina e foram eluídas junto com a ADAM23 (Figura 19, linhas 2 e 3) uma vez que IgG de camundongo foi utilizada como controle (Figura 19, linha 1) e apresenta padrão de reconhecimento semelhante aquele observado para os complexos imunoprecipitados.

Curiosamente, uma banda de menor intensidade imunoprecipitada na condição de 0,5 ug de anti-ADAM23 (linha 3) possui mesmo perfil eletroforético da ADAM23 presente no extrato de encéfalo (controle positivo, linha 4) indicando que parte do procedimento aqui descrito foi bem sucedido na precipitação de ADAM23.

FIGURA 19 – ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA ADAM23 POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE CONJUGADA AO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 PURIFICADO.



FONTE: A autora, 2018

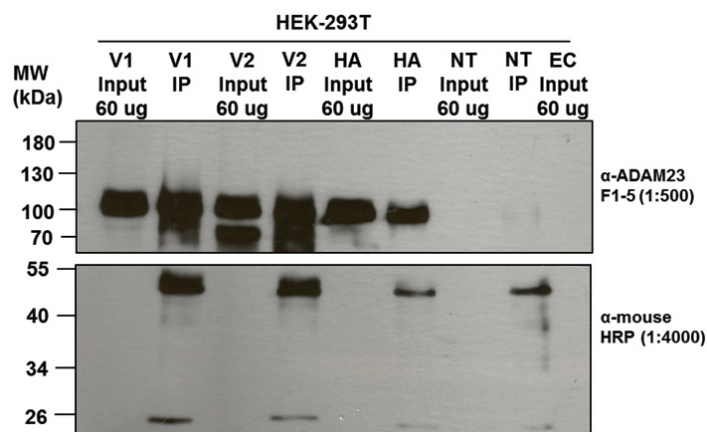
LEGENDA: Todas as IgGs foram incubadas com 1 mg de extrato de encéfalo. **Linha 1:** controle com 1 ug de IgG de camundongo irrelevante (anti-mouse) imunoprecipitado por A/G sepharose. **Linhas 2 e 3:** amostra com 1 ug e 0,5 ug respectivamente de IgG anti-ADAM23 purificado (Frações 3-4 dialisadas). **Linha 4:** controle da reação dos anticorpos com 80 ug de extrato de cerebelo.

Adicionalmente testou-se a capacidade da resina anti-ADAM23-sepharose imunoprecipitar diferentes construções de ADAM23. Lisados de células HEK-293T transfectadas ou não com os vetores de expressão das variantes murinas 1 (pCMV6-ADAM23V1-FLAG) ou 2 (pCMV6-ADAM23V2-FLAG) da ADAM23 e a construção pcDNA3.1-ADAM23-HA, contendo a sequência completa da ADAM23 humana, foram submetidos à reações de imunoprecipitação e os imunocomplexos analisados por *western blotting* (Figura 20) com o monoclonal DL11C8, empregando. Assim, foi possível observar que na transfecção com a variável 2 da ADAM23 (Figura 20A, linha V2 Input), ambas as formas de 70 e 100 kDa dessa proteína foram satisfatoriamente imunoprecipitadas (Figura 20A, linha V2 IP).

No caso da variante 1 da ADAM23 (Figura 20A, linha V1 Input) apenas a forma não-processada de 100 kDa foi expressa nas células HEK, e esta foi eficientemente

imunoprecipitada (Figura 20A, linha V1 IP). Como controle negativo foram utilizados extratos de células HEK 293T não-transfectadas (Figura 20A, linha NT IP).

FIGURA 20 – ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DAS FORMAS DE ADAM23 POR PROTEÍNA A/G SEPHAROSE CONJUGADA AO MONOCLONAL ANTI-ADAM23 PURIFICADO.



FONTE: A autora, 2018.

LEGENDA: Em (A) Imunoprecipitação (IP) das formas de ADAM23 de extrato de HEK-293T transfectadas através do anti-ADAM23 conjugado à resina de proteína A/G Sepharose. **V1**: variável 1 da sequência completa da ADAM23 murina decorrente da transfecção com pCMV6-ADAM23V1-FLAG; **V2**: variável 2 da sequência completa da ADAM23 murina decorrente da transfecção com pCMV6-ADAM23V2-FLAG; **HA**: sequência completa da ADAM23 humana com etiqueta de hemaglutinina decorrente da transfecção com pcDNA3.1-ADAM23-HA; **NT**: controle negativo não-transfectado; **EC**: extrato de cerebelo de rato. Input: controles com extratos que não foram imunoprecipitados. Na transfecção com a variável 2 da ADAM23 foi possível imunoprecipitar ambas as formas de 70 e 100 kDa dessa proteína.

Foi realizado um BLAST e alinhamento das sequências obtidas a partir do vetor contendo a variável 1 com a sequência obtida a partir do vetor contendo a variável 2 comparadas entre elas e com as sequências das isoformas endógenas da ADAM23 provenientes do mRNA após o *splicing*. Observou-se que o vetor pCMV6-ADAM23V1-FLAG expressa apenas a forma de 100 kDa, e que existe uma pequena diferença na sequência da cauda citoplasmática, a partir dos aminoácidos 800 a 832, entre essas formas da ADAM23 provenientes de cada vetor (Figura 21).

Uma vez que o vetor contendo a variante 2 levou à expressão de ambas as formas de ADAM23, tais dados tomados em conjunto indicam que o domínio citoplasmático possui importante função, ainda não descrita, para o processamento de ADAM23.

FIGURA 21 – AS VARIANTES 1 E 2 DE ADAM23 POSSUEM DIVERGÊNCIAS NA CAUDA CITOPLASMÁTICA.

075077	ADA23_HUMAN	1	IKPPGSSSRQPLAGCSLAGASCGPQGPAGVSPASAPARTPPCRLLLVLLPPLAASS	60
075077-2	ADA23_HUMAN	1	IKPPGSSSRQPLAGCSLAGASCGPQGPAGVSPASAPARTPPCRLLLVLLPPLAASS	60
075077-3	ADA23_HUMAN	1	IKPPGSSSRQPLAGCSLAGASCGPQGPAGVSPASAPARTPPCRLLLVLLPPLAASS	60
pCMV6-ADA123V1-FLAG		1	IKPPGSSSRPTLTGCSLPGASCGPQGPAGVSPASAPARTPPCRLLLVLLPALATSS	56
pCMV6-ADA123V2-FLAG		1	IKPPGSSSRPTLTGCSLPGASCGPQGPAGVSPASAPARTPPCRLLLVLLPALATSS	56
075077	ADA23_HUMAN	61	RPRAGAAAPSAPHINETAENLGVLADEDTLQQNSS-SNISYSNAHQEITLPSRLTY	119
075077-2	ADA23_HUMAN	61	RPRAGAAAPSAPHINETAENLGVLADEDTLQQNSS-SNISYSNAHQEITLPSRLTY	119
075077-3	ADA23_HUMAN	61	RPRAGAAAPSAPHINETAENLGVLADEDTLQQNSS-SNISYSNAHQEITLPSRLTY	119
pCMV6-ADA123V1-FLAG		57	RPRARGAAAPSAPHINETAENLGVLADEDTLQQNSSRNITSYSSAVQKEITLPSRLTY	116
pCMV6-ADA123V2-FLAG		57	RPRARGAAAPSAPHINETAENLGVLADEDTLQQNSSRNITSYSSAVQKEITLPSRLTY	116
075077	ADA23_HUMAN	120	YINQDSESPYHVDTKARHQKHKAVHLAQASQIEAFGSKFLDILINLGLSSDYVE	179
075077-2	ADA23_HUMAN	120	YINQDSESPYHVDTKARHQKHKAVHLAQASQIEAFGSKFLDILINLGLSSDYVE	179
075077-3	ADA23_HUMAN	120	YINQDSESPYHVDTKARHQKHKAVHLAQASQIEAFGSKFLDILINLGLSSDYVE	179
pCMV6-ADA123V1-FLAG		117	YINQDSESPYHVDTKARHQKHKAVHLAQASQIEAFGSKFLDILINLGLSSDYVE	176
pCMV6-ADA123V2-FLAG		117	YINQDSESPYHVDTKARHQKHKAVHLAQASQIEAFGSKFLDILINLGLSSDYVE	176
075077	ADA23_HUMAN	180	IHYENGKPYSGGHECHYHGSIRGVKDSKVALSTCNGLHGIFEDOTFYHIEPLELVD	239
075077-2	ADA23_HUMAN	180	IHYENGKPYSGGHECHYHGSIRGVKDSKVALSTCNGLHGIFEDOTFYHIEPLELVD	239
075077-3	ADA23_HUMAN	180	IHYENGKPYSGGHECHYHGSIRGVKDSKVALSTCNGLHGIFEDOTFYHIEPLELVD	239
pCMV6-ADA123V1-FLAG		177	IHYEDGKQYISGGHECHYHGSIRGVKDSKVALSTCNGLHGIFEDOTFYHIEPLELTD	236
pCMV6-ADA123V2-FLAG		177	IHYEDGKQYISGGHECHYHGSIRGVKDSKVALSTCNGLHGIFEDOTFYHIEPLELTD	236
075077	ADA23_HUMAN	240	EKSTGRPHIIOKTLAGQYSKQKINLTHRGDQIPFLSELQILKRRKRAVNSRGVFEHK	299
075077-2	ADA23_HUMAN	240	EKSTGRPHIIOKTLAGQYSKQKINLTHRGDQIPFLSELQILKRRKRAVNSRGVFEHK	299
075077-3	ADA23_HUMAN	240	EKSTGRPHIIOKTLAGQYSKQKINLTHRGDQIPFLSELQILKRRKRAVNSRGVFEHK	299
pCMV6-ADA123V1-FLAG		237	EKSTGRPHIIOKTLAGQYSKQKINLTHRGDQIPFLSELQILKRRKRAVNSRGVFEHK	296
pCMV6-ADA123V2-FLAG		237	EKSTGRPHIIOKTLAGQYSKQKINLTHRGDQIPFLSELQILKRRKRAVNSRGVFEHK	296
075077	ADA23_HUMAN	300	YLELIIVNDHKTYYKRRSSHAHTNFAKSVNLVDSIYKEQLNTRVLVAVETHEKDQI	359
075077-2	ADA23_HUMAN	300	YLELIIVNDHKTYYKRRSSHAHTNFAKSVNLVDSIYKEQLNTRVLVAVETHEKDQI	359
075077-3	ADA23_HUMAN	300	YLELIIVNDHKTYYKRRSSHAHTNFAKSVNLVDSIYKEQLNTRVLVAVETHEKDQI	359
pCMV6-ADA123V1-FLAG		297	YLELIIVNDHKTYYKRRSSHAHTNFAKSVNLVDSIYKEQLNTRVLVAVETHEKDI	356
pCMV6-ADA123V2-FLAG		297	YLELIIVNDHKTYYKRRSSHAHTNFAKSVNLVDSIYKEQLNTRVLVAVETHEKDI	356
075077	ADA23_HUMAN	360	DTTNIPVQILHDFSKYRQRIKHADAVHLISRVTFHYKRSSLVYFGGVSRTRGVNEY	419
075077-2	ADA23_HUMAN	360	DTTNIPVQILHDFSKYRQRIKHADAVHLISRVTFHYKRSSLVYFGGVSRTRGVNEY	419
075077-3	ADA23_HUMAN	360	DTTNIPVQILHDFSKYRQRIKHADAVHLISRVTFHYKRSSLVYFGGVSRTRGVNEY	419
pCMV6-ADA123V1-FLAG		357	DTTNIPVQILHDFSKYRQRIKHADAVHLISRVTFHYKRSSLVYFGGVSRIIRGVNEY	416
pCMV6-ADA123V2-FLAG		357	DTTNIPVQILHDFSKYRQRIKHADAVHLISRVTFHYKRSSLVYFGGVSRIIRGVNEY	416
075077	ADA23_HUMAN	420	GLPHIAVAQLSQSLAQNLGIQIEPSSRKPKCDTESHGDCIHEETGVSHSRKFSKCSILE	479
075077-2	ADA23_HUMAN	420	GLPHIAVAQLSQSLAQNLGIQIEPSSRKPKCDTESHGDCIHEETGVSHSRKFSKCSILE	479
075077-3	ADA23_HUMAN	420	GLPHIAVAQLSQSLAQNLGIQIEPSSRKPKCDTESHGDCIHEETGVSHSRKFSKCSILE	479
pCMV6-ADA123V1-FLAG		417	GLPHIAVAQLSQSLAQNLGIQIEPSSRKPKCDTESHGDCIHEETGVSHSRKFSKCSILE	476
pCMV6-ADA123V2-FLAG		417	GLPHIAVAQLSQSLAQNLGIQIEPSSRKPKCDTESHGDCIHEETGVSHSRKFSKCSILE	476
075077	ADA23_HUMAN	480	YRDFLQRGGGACLFNRPTKLFPEPTCEGNGYVAGEECDCGFHVECYGLCKCKCSLNGAH	539
075077-2	ADA23_HUMAN	480	YRDFLQRGGGACLFNRPTKLFPEPTCEGNGYVAGEECDCGFHVECYGLCKCKCSLNGAH	539
075077-3	ADA23_HUMAN	480	YRDFLQRGGGACLFNRPTKLFPEPTCEGNGYVAGEECDCGFHVECYGLCKCKCSLNGAH	539
pCMV6-ADA123V1-FLAG		477	YRDFLQRGGGACLFNRPTKLFPEPTCEGNGYVAGEECDCGFHVECYGLCKCKCSLNGAH	536
pCMV6-ADA123V2-FLAG		477	YRDFLQRGGGACLFNRPTKLFPEPTCEGNGYVAGEECDCGFHVECYGLCKCKCSLNGAH	536
075077	ADA23_HUMAN	540	CSDGPCNNITSLCFQPRGYECDAVNECDITEYCTGDSGQCPHILHKQGYACNQNGRC	599
075077-2	ADA23_HUMAN	540	CSDGPCNNITSLCFQPRGYECDAVNECDITEYCTGDSGQCPHILHKQGYACNQNGRC	599
075077-3	ADA23_HUMAN	540	CSDGPCNNITSLCFQPRGYECDAVNECDITEYCTGDSGQCPHILHKQGYACNQNGRC	599
pCMV6-ADA123V1-FLAG		537	CSDGPCNNITSLCFQPRGYECDAVNECDITEYCTGDSGQCPHILHKQGYACNQNGRC	596
pCMV6-ADA123V2-FLAG		537	CSDGPCNNITSLCFQPRGYECDAVNECDITEYCTGDSGQCPHILHKQGYACNQNGRC	596
075077	ADA23_HUMAN	600	YNGECKTRDNQCYIHTGKAAGSKDFCYEKLNTGTEKGNKGKDGDRHITQCSKHDFVCFG	659
075077-2	ADA23_HUMAN	600	YNGECKTRDNQCYIHTGKAAGSKDFCYEKLNTGTEKGNKGKDGDRHITQCSKHDFVCFG	659
075077-3	ADA23_HUMAN	600	YNGECKTRDNQCYIHTGKAAGSKDFCYEKLNTGTEKGNKGKDGDRHITQCSKHDFVCFG	659
pCMV6-ADA123V1-FLAG		597	YNGECKTRDNQCYIHTGKAAGSKDFCYEKLNTGTEKGNKGKDGDRHITQCSKHDFVCFG	656
pCMV6-ADA123V2-FLAG		597	YNGECKTRDNQCYIHTGKAAGSKDFCYEKLNTGTEKGNKGKDGDRHITQCSKHDFVCFG	656
075077	ADA23_HUMAN	660	LLCTNLTRAPRIGQLQGEIIPTSFYHQGRVIDCSGAHVLDODTGVGVEDGTPCGPSH1	719
075077-2	ADA23_HUMAN	660	LLCTNLTRAPRIGQLQGEIIPTSFYHQGRVIDCSGAHVLDODTGVGVEDGTPCGPSH1	719
075077-3	ADA23_HUMAN	660	LLCTNLTRAPRIGQLQGEIIPTSFYHQGRVIDCSGAHVLDODTGVGVEDGTPCGPSH1	719
pCMV6-ADA123V1-FLAG		657	LLCTNLTRAPRIGQLQGEIIPTSFYHQGRVIDCSGAHVLDODTGVGVEDGTPCGPSH1	716
pCMV6-ADA123V2-FLAG		657	LLCTNLTRAPRIGQLQGEIIPTSFYHQGRVIDCSGAHVLDODTGVGVEDGTPCGPSH1	716
075077	ADA23_HUMAN	720	CLDRKCLQIQALNISSCPLDSRGKVCSDHGVCSNEATCICDFTUAGTDCSIRDPVRNLHP	779
075077-2	ADA23_HUMAN	720	CLDRKCLQIQALNISSCPLDSRGKVCSDHGVCSNEATCICDFTUAGTDCSIRDPVRNLHP	779
075077-3	ADA23_HUMAN	720	CLDRKCLQIQALNISSCPLDSRGKVCSDHGVCSNEATCICDFTUAGTDCSIRDPVRNLHP	779
pCMV6-ADA123V1-FLAG		717	CLDRKCLQIQALNISSCPLDSRGKVCSDHGVCSNEATCICDFTUAGTDCSIRDPVRNLHP	776
pCMV6-ADA123V2-FLAG		717	CLDRKCLQIQALNISSCPLDSRGKVCSDHGVCSNEATCICDFTUAGTDCSIRDPVRNLHP	776
075077	ADA23_HUMAN	780	PKDEGPKGPSATNLIGS-IGAG----AII--VAAIVLGGTGWGFKNVKRRFDPDTPQGP1	832
075077-2	ADA23_HUMAN	780	PKDEGPKGPSATNLIGS-IGAG----AII--VAAIVLGGTGWGFKNVKRRFDPDTPQGP1	832
075077-3	ADA23_HUMAN	780	PKDEGPKGPSATNLIGS-IGAG----AII--VAAIVLGGTGWGFKNVKRRFDPDTPQGP1	832
pCMV6-ADA123V1-FLAG		777	PKDEGPKGPSATNLIGS-IGAG----AII--VAAIVLGGTGWGFKNVKRRFDPDTPQGP1	829
pCMV6-ADA123V2-FLAG		777	PKDEGPKGPSATNLIGS-IGAG----AII--VAAIVLGGTGWGFKNVKRRFDPDTPQGP1	829
075077	ADA23_HUMAN	833	-----	832
075077-2	ADA23_HUMAN	833	-----	832
075077-3	ADA23_HUMAN	833	-----	832
pCMV6-ADA123V1-FLAG		830	CTILSEAY	837
pCMV6-ADA123V2-FLAG		830	-----	829

FONTE: A autora através do alinhamento pela plataforma Uniprot, 2018.

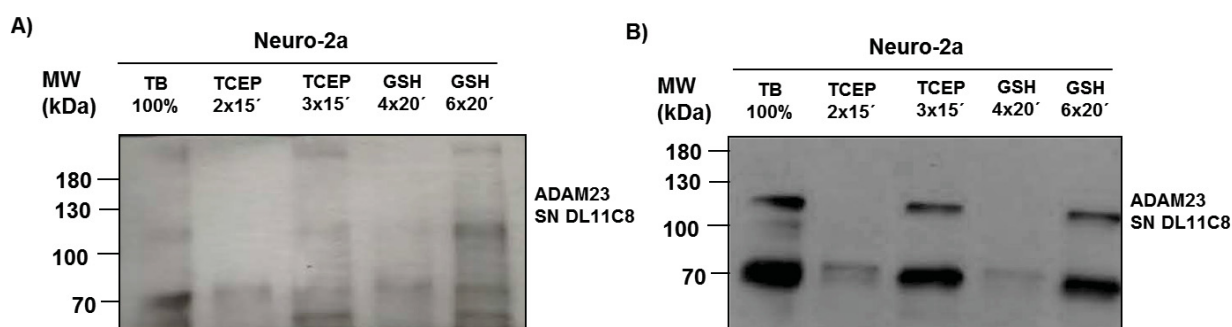
LEGENDA: Foi feito um alinhamento comparativo das sequências das isoformas endógenas de ADAM23 derivadas do *splicing* comparadas com as sequências das variantes 1 e 2 de ADAM23 provenientes do vetor pCMV6 (Origene). É possível ver diferenças na cauda citoplasmática entre as variantes 1 e 2 da proteína ADAM23 a partir do aminoácido 800 até o último.

4.5. Teste de eficiência do *stripping* da ADAM23 biotinilada da membrana plasmática por dois diferentes agentes redutores TCEP e GSH (glutathiona reduzida).

No experimento de internalização é fundamental que após a entrada das diferentes moléculas na célula (incluindo ADAM23) aquelas que ainda permaneceram no ambiente extracelular tenham a marcação de biotina eficientemente removida. Tal procedimento permite a comparação entre a população de moléculas endocitadas em dado tempo da curva temporal com o total de moléculas marcadas com biotinas (tempo zero). Vários autores descrevem a glutathiona-reduzida (GSH) como um agente redutor eficiente para a biotina conjugada à maioria das proteínas de superfície celular (GABRIEL *et al.*, 2009; STAUTZ *et al.*, 2012).

O uso de GSH foi mais adequado na visualização da ADAM23 internalizada, uma vez que, não clivou nem reduziu partes da própria molécula de ADAM23 (Figura 22), como ocorreu no *stripping* com TCEP (dados não mostrados). Em comparação ao GSH, o TCEP (GABRIEL *et al.*, 2009) foi o mais eficiente na remoção das etiquetas de biotina, tendo sido utilizado em experimento da cinética de internalização do PrPc (dados não mostrados). Entretanto, como se pretendia avaliar prioritariamente a endocitose de ADAM23, optou-se pelo uso do GSH, já que este reagente não produz modificações químicas indesejáveis como aquelas induzidas pelo TCEP (dados não mostrados).

FIGURA 22 – EFICIÊNCIA DO TCEP SOBRE O GSH NA REDUÇÃO/STRIPPING DA BIOTINA RESIDUAL LIGADA ÀS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR NOS ENSAIOS DE CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO.



FONTE: A autora, 2018.

LEGENDA: **MW**: peso molecular (*molecular weight*). **TB**: Total biotinilado sem stripping com glutathiona GSH. **TCEP 2x15'**; **3x15'**: Stripping realizado com agente redutor TCEP com 2 e 3 lavagens de 15 minutos, respectivamente. **GSH 4x20'**; **6x20'**: Stripping feito com agente redutor glutathiona reduzida GSH com 4 e 6

lavagens de 20 minutos, respectivamente. Todas as lavagens foram feitas em banho de gelo em câmara fria a 4°C. Todas as amostras de extrato de células N2A biotiniladas foram reagidas com SN do hibridoma DL11C8 contendo anticorpos monoclonais anti-ADAM23. Em (A) exposição de 5 min. da membrana ao filme e em (B), exposição de 10 min. ambas em filme sensível.

4.6. Avaliação da cinética de internalização da ADAM23 em neuroblastoma murino N2A.

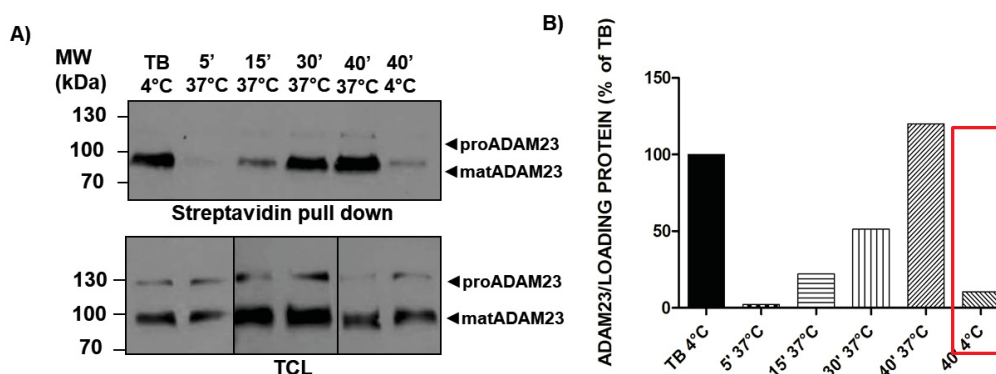
Células N2A transfectadas com o vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG (Origene) (sequência inteira da ADAM23 murina ou “full-length”) foram submetidas ao ensaio de internalização com base na biotilação das proteínas de superfície celular. Como a quantidade de ADAM23 endógena em várias linhagens celulares é muito baixa para ser detectada (dados não mostrados), assim como ocorre para a ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012), optou-se pela superexpressão da ADAM23 em N2A através da transfecção com *Lipofectamine 2000*. Na Figura 23 pode ser observado que começa a ser internalizada em 15 minutos a forma de 70 kDa de ADAM23 (ADAM23^{70kDa}) (Figura 23A, linhas 15'-40'). Aparentemente esse resultado sugere que ADAM23^{70kDa} é totalmente internalizada em 40 minutos. Já a forma de 100 kDa (seta proADAM23) foi pouco detectada e, por isso, nada pode ser afirmado sobre a sua cinética de internalização.

Estes dados corroboram com aqueles já descritos na literatura (GOLDSMITH *et al.*, 2004; BORGONOVO *et al.*, 2018) que apontam para uma pequena expressão da forma de 100 kDa na membrana plasmática. Foram necessários ajustes experimentais uma vez que o controle de eficiência da remoção de biotina das proteínas não internalizadas com o agente redutor GSH (linha 40', 4°C) deveria apresentar intensidade de no máximo 10% daquele observado para o total de ADAM23 biotinilada (linha TB, tempo 0). Com base na intensidade de ADAM23 em 40 min parece que quase toda a proteína que estava na membrana foi internalizada nesse tempo, uma vez que, essa intensidade é semelhante à do controle do total biotinilado (TB) (Figura 23A).

A análise densitométrica das bandas correspondentes (Figura 23B) revelou que a remoção de biotina teve eficiência inferior de 90%, não sendo possível uma análise quantitativa da taxa de internalização de ADAM23, nestas condições experimentais, conforme recomendado na literatura (GABRIEL *et al.*, 2009). Uma possível explicação para esta discrepância poderia ser que a quantidade de matriz cromatográfica (streptavidina-Agarose) empregada na precipitação ou “pull-down” desta condição

experimental (TB, tempo 0) não tenha sido suficiente para capturar toda a fração biotinilada de ADAM23. Nesta etapa espera-se que a maioria das proteínas na membrana plasmática também estejam marcadas com biotina, o que resulta em competição entre a ADAM23 e todas as outras proteínas de superfície derivatizadas com biotina pela mesma quantidade de avidina. Assim, um excesso de matriz cromatográfica precisou ser utilizado para garantir que toda a ADAM23 biotinilada fosse capturada nestas condições. Outra possibilidade para uma baixa eficiência de remoção da biotina foi o numero e/ou tempo de incubação inadequados com o agente redutor (tampão com glutationa).

FIGURA 23 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS MURINOS N2A.



FONTE: A autora, 2018.

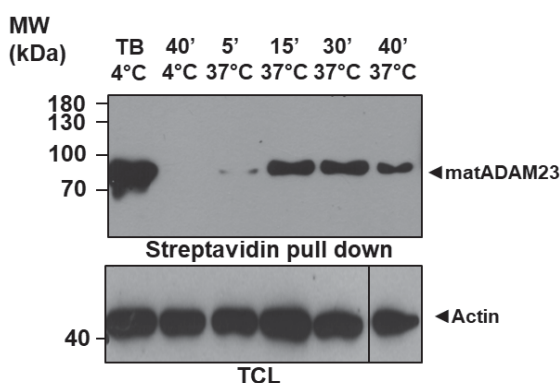
LEGENDA: Extratos de células N2A, expressando transientemente ADAM23 humana previamente biotiniladas, submetidos a um *pull-down* com streptavidina-agarose (A) (painel superior) e controles *inputs* de 5 ug do lisado total (TCL, painel inferior). (B) Densitometria referente às bandas apenas do *western blot* da esquerda, mostrando que o controle a 4°C ficou inadequado e superior aos 10% do total biotinilado (retângulo vermelho). **TB**: total de proteínas biotiniladas; **BL**: células biotiniladas e submetidas ao ensaio de internalização por 5, 15, 30 e 40 min. a 37°C e um controle da internalização por 40 min. a 4°C. **TCL**: *total cell lysate*, lisado celular total. Reações com anti-ADAM23 de SN DL11C8 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) HRP (1:3.000).

Após nova série de tentativas e modificações foi possível estabelecer condições experimentais em que o controle (Figura 24A, 40' a 4°C) ficou adequado e abaixo dos 10% do valor do total biotinilado (Figura 24A, TB: células não submetidas ao *stripping*). O controle total biotinilado teve intensidade superior às demais amostras, conforme recomendado na literatura (STAUTZ e colaboradores, 2012, valores de densitometria não

mostrados). O ensaio foi repetido com os mesmos parâmetros de tempo do experimento anterior (comparar Figura 23 com a 24).

Foi possível observar novamente que a internalização de ADAM23 começa em 15 min e aumenta com o tempo. Entretanto, nesse ensaio, a intensidade de ADAM23 internalizada em 40 min é menor que a do controle total biotilado (Figura 24), sugerindo que possa ocorrer reciclagem de uma pequena quantidade de ADAM23 de volta para a membrana. Para comprovar se uma parte da quantidade de ADAM23 está sendo reciclada, outros ensaios de reciclagem por imunofluorescência com remoção do anticorpo ligado à ADAM23 na membrana com pH ácido (*stripping* ácido) foram realizados por outro membro do projeto de pesquisa.

FIGURA 24 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS MURINO N2A.



FONTE: A autora, 2018.

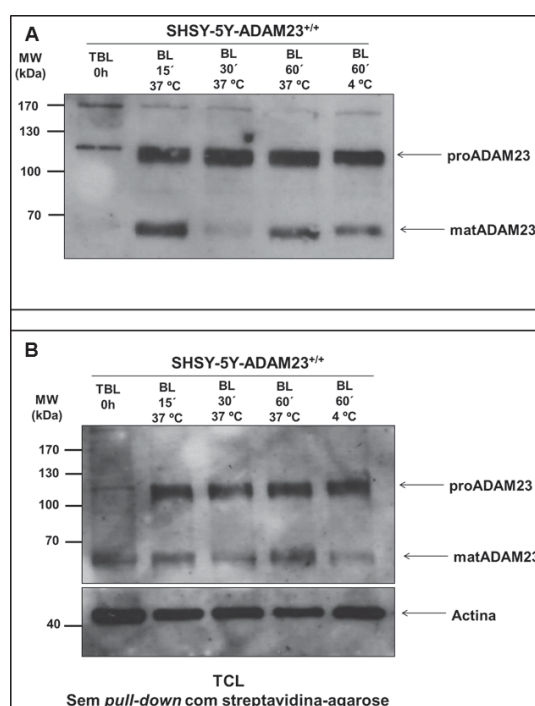
LEGENDA: Extratos de células N2A, expressando transientemente ADAM23 humana previamente biotiladas, submetidos a uma precipitação “pull-down” com streptavidina-agarose (painel superior) e controle total lisado com beta-actina (TCL, painel inferior). É possível ver que para a forma de 70 kDa a quantidade de ADAM23 internalizada decai em 15 min. após o início do ensaio de internalização. **TB**: total de proteínas biotiladas; **BL**: células biotiladas e submetidas ao ensaio de internalização por 5, 15, 30 e 40 min. a 37°C e um controle da internalização por 40 min. a 4°C. **TCL**: *total cell lysate*, lisado celular total. Reações com anti-ADAM23 de SN DL11C8 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) HRP (1:3.000).

Esse tipo de ensaio será importante para investigar se a endocitose de ADAM23 é dependente de clatrina e Grb2, assim como demonstrado para ADAM12 e os domínios estruturais em que ela se liga (STAUTZ *et al.*, 2012). Quanto ao processo de endocitose tomado em seu conjunto, a metodologia aqui estabelecida foi importante para

acompanhar o tráfego intracelular da ADAM23. Dessa forma, foi possível identificar se a mesma se localizava em endossomos precoces e/ou se transitava pelas vias de reciclagem rápida (por endossomos que expressam Rab4) ou lenta (por endossomos que expressam Rab11), como já havia sido observado para outro membro da família das ADAMs (STAUTZ *et al.*, 2012).

Para a linhagem de neuroblastoma humano SHSY-5Y, o ensaio ficou inadequado, pois o controle TBL, total biotinilado ficou abaixo da intensidade das amostras da internalização e o controle a 4°C ficou muito acima de 10% do valor do total biotinilado. Nessa linhagem, a ADAM23 foi internalizada em 15 min. e em 30 min. ela parece voltar para a membrana. Entretanto, esse ensaio não pôde ser considerado válido (Figura 25).

FIGURA 25 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS DE NEUROBLASTOMAS HUMANO SHSY-5Y.



FONTE: A autora, 2017.

LEGENDA: Extratos de células SHSY-5Y, expressando transientemente ADAM23 humana previamente biotiniladas, submetidos a um *pull-down* com streptavidina-agarose (A), controles não-incubados com streptavidina-agarose, sem *pull-down*, 5 ul de cada amostra (B). Em A, é possível ver uma internalização homogênea da forma de 100 kDa da ADAM23 para os vários time-points; para a forma de 70 kDa a quantidade de ADAM23 internalizada decai em 30 min. após o início do ensaio de internalização. **TBL**: total de proteínas biotiniladas; **CNE/NT**: controle negativo não-transfectado; **BL**: células biotiniladas e submetidas ao ensaio de internalização por 15, 30 e 60 min. a 37°C e um controle da internalização por 60

min. a 4°C. **TCL:** *total cell lysate*, lisado celular total. Reações com anti-ADAM23 de ascite (1:200) e controle com anti- β -actina (1:5.000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) HRP (1:2.000).

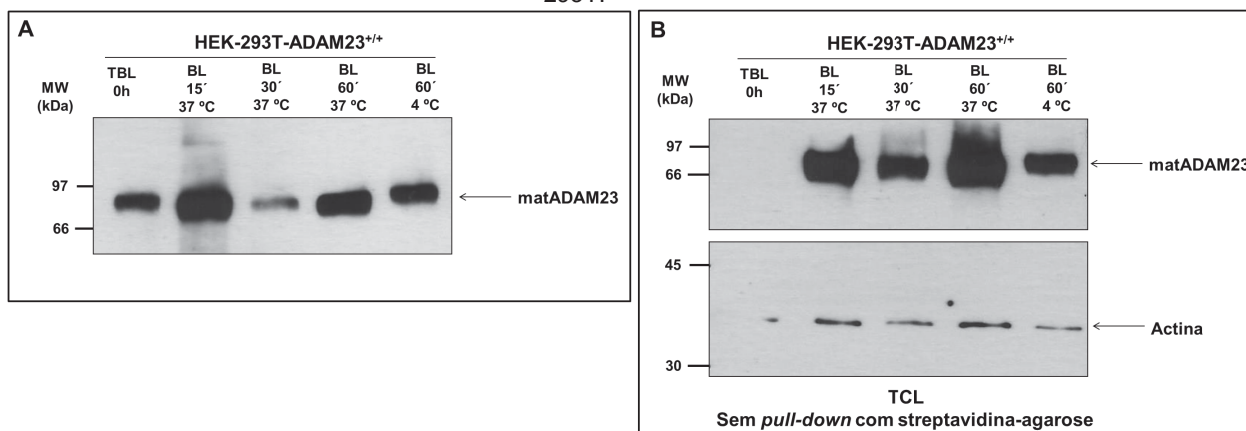
Para a linhagem de rim de embrião humano, HEK-293T (que foi escolhida por permitir o uso da transfecção com fosfato de cálcio, economicamente mais viável), o ensaio também ficou inadequado, com problemas no controle TBL, total biotinilado, que ficou abaixo da intensidade das amostras da internalização. Também houve problema no controle a 4°C que ficou muito acima de 10% do valor do total biotinilado, como ocorreu com a linhagem SHSY-5Y. Nessa linhagem, a ADAM23 foi internalizada em 15 min e em 30 min ela parece voltar para a membrana. Dessa forma, o ensaio com essa linhagem precisa ser repetido e melhor investigado. Pode ser que a cinética de internalização da ADAM23 varie conforme a linhagem e origem do tecido.

Dessa forma, em ambas as linhagens celulares foi observado um ciclo de internalização da ADAM23, em que essa proteína parece ser internalizada em 15 min., reciclada de volta para a membrana plasmática em 30 min. e novamente internalizada em 1 hora (Figura 26A, linhas BL30' e BL60'). Embora esse ciclo tenha sido identificado também em SHSY-5Y, em HEK293T só foi possível observar a forma processada/matura de 70 kDa (matADAM23) com esse padrão de internalização, não tendo sido detectada a pró-forma de 100 kDa (proADAM23). Esse achado pode ser comparado aos resultados obtidos para ADAM12, onde a internalização parece ocorrer apenas para a forma processada (matura) e a reciclagem parece ocorrer em até 30 min. em HEK293VnR (STAUTZ *et al.*, 2012).

É importante destacar que, com base no mesmo ensaio realizado por Stautz e colaboradores, 2012, outros tempos maiores de internalização foram testados (2h, 4h, 6h, 8h) (dados não mostrados). Entretanto, assim como ocorreu para a ADAM12, a intensidade de ADAM23 internalizada permaneceu a mesma nos tempos testados 1 hora após o início da internalização (dados não mostrados).

Os controles da quantidade de proteína total internalizada, mas não submetida à precipitação (*"pulldown"*) com streptavidina-agarose (Figura 26B, setas matADAM23 e actina) mostraram que a quantidade de proteína total internalizada e submetida à precipitação com avidina-agarose (*"pulldown"* com a resina) foi praticamente a mesma corroborando a confiabilidade da quantidade de proteína internalizada. Pode ser que a cinética de internalização da ADAM23 varie conforme a linhagem e origem do tecido.

FIGURA 26 – CINÉTICA DE INTERNALIZAÇÃO DA ADAM23 EM CÉLULAS HEK-293T.



FONTE: A autora, 2017.

LEGENDA: Extratos de células HEK-293T, expressando transientemente ADAM23 humana previamente biotiniladas, submetidos a um *pull-down* com streptavidina-agarose (A), controles sem *pull-down*, não-incubados com streptavidina-agarose, 5 ul de cada amostra (B). Em A, é possível identificar uma variação na quantidade de ADAM23 internalizada apenas para a forma de 100 kDa, em 30 min. após o início da internalização nessa linhagem celular. TBL: total de proteínas biotiniladas; BL: células biotiniladas e submetidas ao ensaio de internalização por 15, 30 e 60 min. a 37°C e um controle da internalização por 60 min. a 4°C. TCL: *total cell lysate*, lisado celular total. Reações com anti-ADAM23 de ascite (1:200) e controle com anti-β-actina (1:5.000) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) HRP (1:2.000).

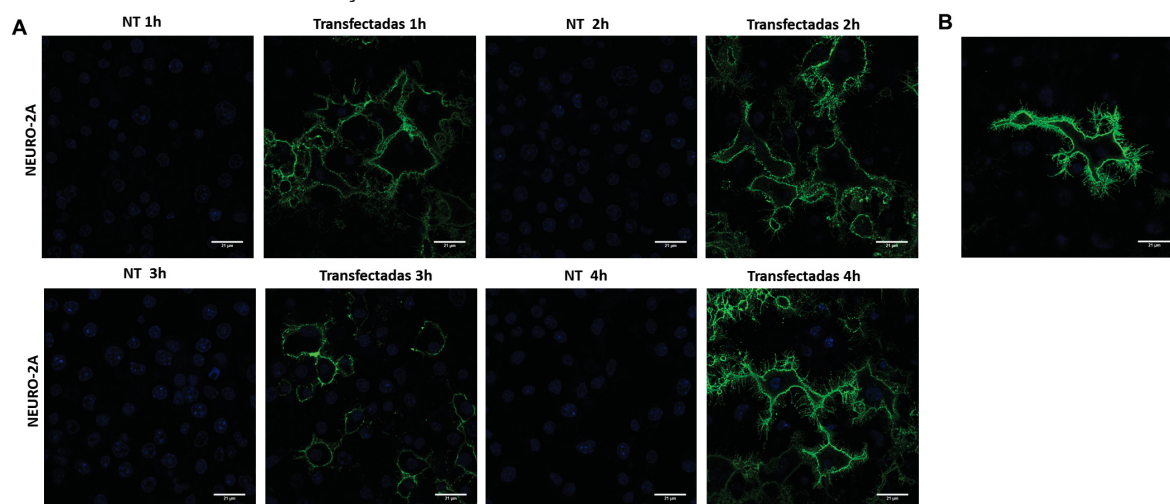
4.7. Cinética de internalização da ADAM23 por imunofluorescência.

Com o objetivo de testar o deslocamento da ADAM23 a partir da membrana e acompanhar o tráfego intracelular sob uma abordagem experimental distinta e complementar daquela anteriormente descrita (Figuras 23 e 24) procurou-se marcar a ADAM23 da superfície celular com anticorpos específicos (MoAb DL11C8) e acompanhar a internalização do imunocomplexo em diferentes tempos por microscopia confocal, conforme já descrito para ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012) e o receptor de EGF (LIU *et al.*, 2013).

Inicialmente, com objetivo de testar a ligação do anti-ADAM23 na membrana de células N2A superexpressando ou não a ADAM23, foi realizado um primeiro ensaio de imunofluorescência. Nesse ensaio, foi possível observar que o anti-ADAM23 ligou-se de forma satisfatória na ADAM23 da membrana de células N2A transfectadas independentemente do tempo de incubação (Figura 27, Transfectadas). Entretanto, não

foi possível detectar a ADAM23 endógena com essa abordagem, nem incubando o anti-ADAM23 por mais tempo (Figura 27, NT). Dessa forma, ficou estabelecido que os ensaios de internalização seriam todos conduzidos com células superexpressando ADAM23, em modelo celular (em células N2A) igual àquele previamente empregado nos ensaios de biotinylação (Figuras 23 e 24). Além disso, o tempo de incubação do anticorpo anti-ADAM23 seria de 2 h a 4°C, pois tal condição mostrou-se adequada para a condução dos experimentos posteriores. Os tempos de incubação foram testados apenas na temperatura de 4°C para evitar a internalização do complexo anticorpo-proteína.

FIGURA 27 – TESTE DE LIGAÇÃO DO ANTI-ADAM23 NA MEMBRANA PLASMÁTICA DE CÉLULAS N2A.



FONTE: A autora, 2019.

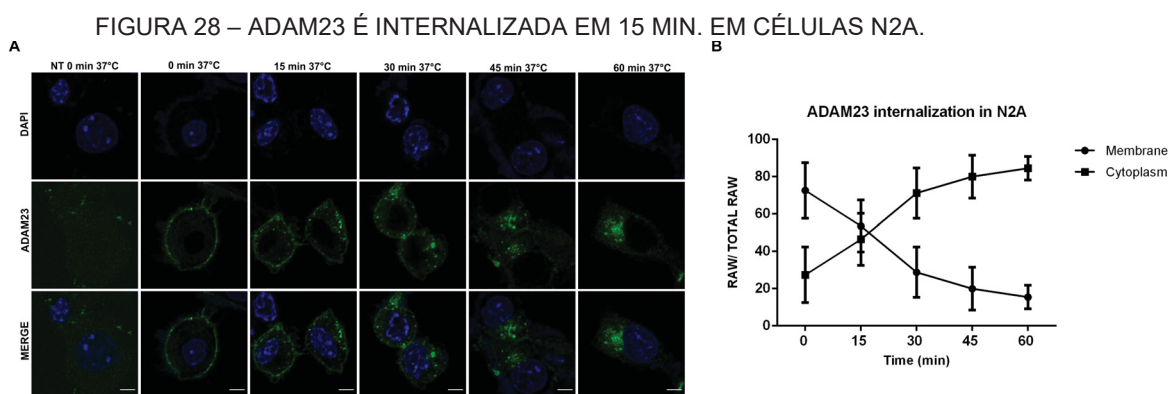
LEGENDA: (A) Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) e não-transfectadas (com ADAM23 endógena) foram incubadas a 37°C por: 5, 15, 30, 45 e 60 min.. Células foram marcadas com anti-ADAM23 por diferentes tempos: 1, 2, 3 e 4 h a 4°C e depois marcadas com secundário Alexa 488 (verde). Reações feitas com anti-ADAM23 (sobrenadante de DL11C8 12,5X concentrado em Amicon) e secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (1:400). (B) Detalhe basal de uma célula N2A com as mesmas marcações. Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Cortes utilizados foram de Z=2 a 5, sendo cada corte de 0,5 µm. Os cortes utilizados abrangem a parte mais basal das células N2A. Escala da barra = 21 µm.

Uma vez estabelecidas as condições de ligação do anti-ADAM23 a 4°C, o acompanhamento da internalização do imunocomplexo por imunofluorescência, ou seja, da endocitose da ADAM23, seguiu tempos semelhantes àqueles empregados na abordagem de biotinylação (Figuras 23 e 24). Foi possível observar que no tempo 0 min a 4°C, a ADAM23 se encontra na membrana plasmática e não é internalizada. Em 15 min. a

37°C, essa proteína começa a ser internalizada, em 30 min. a 37°C já é possível observar que uma parte da ADAM23 se deslocou da membrana para o citoplasma e em 60 min. pode-se ver uma maior quantidade de ADAM23 no citoplasma em relação à membrana plasmática. (Figuras 28A e 28B). A intensidade de ADAM23 internalizada em 15 e 30 min vista em ensaios de *western blot* (Figuras 23 e 24) condiz com as imagens de endocitose da ADAM23 nesses mesmos tempos (Figura 28A).

Com o objetivo de complementar os resultados das imagens de fluorescência da internalização da ADAM23 e de quantificar a ADAM23 internalizada nas células N2A, foi feito o gráfico da razão entre a fluorescência da membrana pela fluorescência total (fluorescência da membrana + fluorescência do citoplasma) e da razão entre a fluorescência do citoplasma pela fluorescência total (fluorescência da membrana + fluorescência do citoplasma) (Figura 28B). Para cada ponto de cada um desses gráficos foi feita a média com o desvio padrão da fluorescência da membrana e citoplasma de 10 células de 3 ensaios diferentes (n=3, cada um com 10 células).

O gráfico abaixo indica que independente da razão das fluorescências da ADAM23 da membrana e do citoplasma pela fluorescência total na célula, a fluorescência da ADAM23 tende a diminuir na membrana e aumentar no citoplasma ao longo do tempo de internalização, indicando um deslocamento da ADAM23 da membrana para o citoplasma (Figura 28B).



FONTE: A autora, 2019.

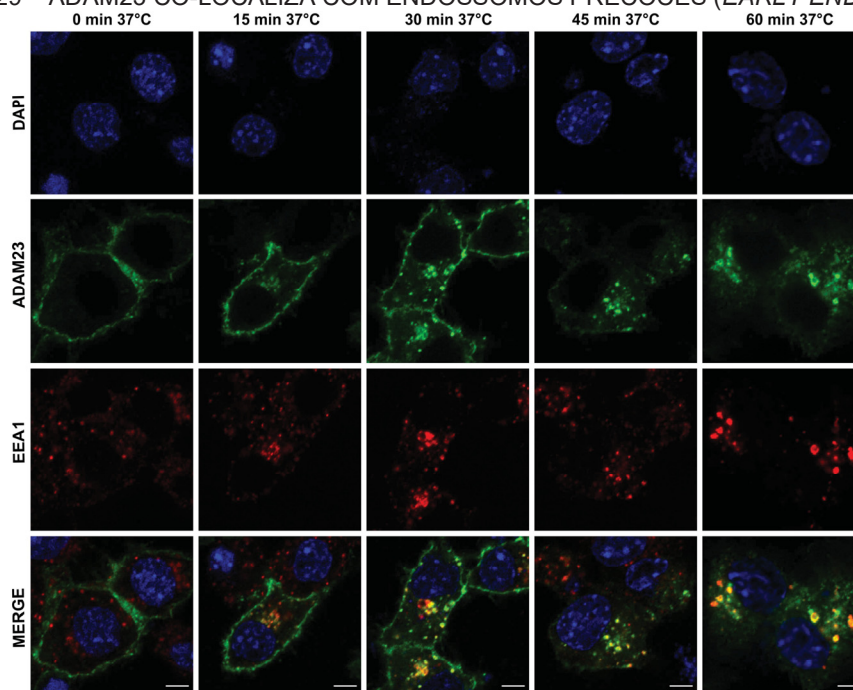
LEGENDA: (A) Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram incubadas a 37°C por: 5, 15, 30, 45 e 60 min.. Reações feitas com anti-ADAM23 (DL11C8) e secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (1:400). Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Escala da barra = 5 µm. Cortes utilizados foram de Z=7 a Z=13, sendo cada corte de 0,5 µm, abrangendo sempre o meio da célula e não as regiões basais e apicais. (B) Gráfico da razão da fluorescência da membrana pela fluorescência total (fluorescência da membrana + fluorescência

do citoplasma) e da razão da fluorescência do citoplasma pela fluorescência total (fluorescência da membrana + fluorescência do citoplasma). Para cada ponto de cada gráfico foi feita uma média e desvio padrão dos dados de fluorescência de 10 células N2A por ensaio (n=3, cada um com 10 células). As imagens não representam uma junção de todos os cortes.

4.8. Tráfego intracelular da ADAM23 por imunofluorescência

Com o objetivo de avaliar o trajeto intracelular da ADAM23 após o início da internalização foi feito um ensaio de internalização associado à imunofluorescência com marcação para endossomos precoces (expressam o antígeno EEA1 positivo) (Figura 29). Foi possível observar que começa a existir co-localização de ADAM23 e endossomo precoce EEA1-positivo em 30 min., sendo que essa co-localização fica mais evidente em 45 min. após o início da internalização.

Isso indica que ADAM23 assim como ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012), entra no citoplasma e vai para o endossomo precoce. A partir do endossomo precoce a carga pode se deslocar para o complexo endocítico juxtenuclear de reciclagem (ERC) (GRANT & DONALDSON, 2009) que fica próximo ao núcleo e por isso é possível observar a co-localização de ADAM23 com endossomo expressando o antígeno EEA1 nessa região em 30 min.

FIGURA 29 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS PRECOCES (*EARLY ENDOSOMES*).

FONTE: A autora, 2019.

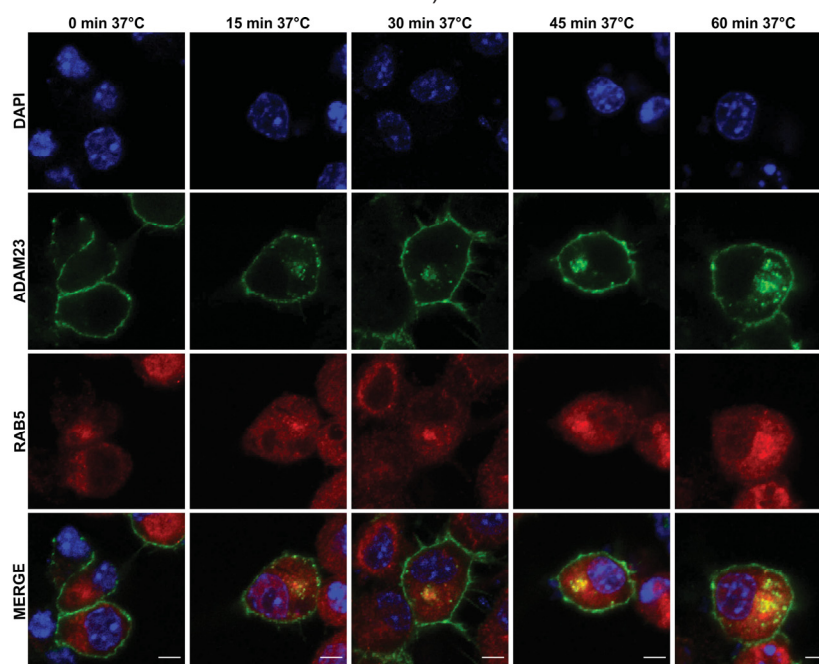
LEGENDA: Ensaio feito da mesma forma que na figura anterior. Detalhe da co-localização em pontos de cor amarela na sobreposição das imagens (merge), em 15 min, em 30 min (quando ocorre uma maior co-localização). Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram incubadas a 37°C por: 5, 15, 30 e 45 min.. Controles negativos (não mostrados):

Ctrl 488: células incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (verde); Ctrl 568: células incubadas somente com secundário anti-IgG de coelho Alexa 568 (vermelho) e NT: células não-transfectadas incubadas 0 min. a 37°C marcadas com anti-ADAM23 + Alexa 488 e anti-EEA1 + Alexa 568. Reações feitas com anti-ADAM23 (DL11C8) e secundário anti-IgG de camundongo Alexa 488 (1:400) e com anti-EEA1 (1:50) e secundário anti-IgG de coelho (anti-rabbit) Alexa 568 (1:400). Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Cortes utilizados foram de Z=7 a Z=13, sendo cada corte de 0,5 µm, abrangendo sempre o meio da célula e não as regiões basais e apicais. Escala da barra = 5 µm.

Com o objetivo de rastrear o tráfego intracelular da ADAM23 após a passagem pelo endossomo precoce (com marcador EEA1 positivo) foi feita uma imunofluorescência com marcação para o endossomo intermediário (com marcador positivo para a proteína Rab5). Foi possível observar que ADAM23 co-localiza com endossomo Rab5 positivo (Figura 30).

O que indica que o trajeto da ADAM23 é pelo endossomo precoce (que expressa EEA1), passando pelo endossomo intermediário (que expressa a proteína Rab5), seguindo para a reciclagem rápida (por endossomo de reciclagem rápida que expressa a proteína Rab4) ou lenta (por endossomo de reciclagem lenta que expressa Rab11).

FIGURA 30 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS INTERMEDIÁRIOS (RAB5-POSITIVOS).



FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram incubadas a 37°C por: 0, 15, 30 e 45 min.. Controles negativos (não mostrados): Ctrl 488: células incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (verde); Ctrl 568: células incubadas somente com secundário anti-IgG de coelho Alexa 568 (vermelho) e NT: células não-transfectadas incubadas 0 min. a 37°C marcadas com anti-ADAM23 + Alexa 488 e anti-Rab5 + Alexa 568. Reações feitas com anti-ADAM23 (DL11C8) e secundário anti-IgG de camundongo Alexa 488 (1:400) e com anti-Rab5 (1:50) e secundário anti-IgG de coelho (anti-rabbit) Alexa 568 (1:400). Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Cortes utilizados foram de Z=7 a Z=13, sendo cada corte de 0,5 µm, mostrando a região intermediária da célula. Escala da barra = 5 µm.

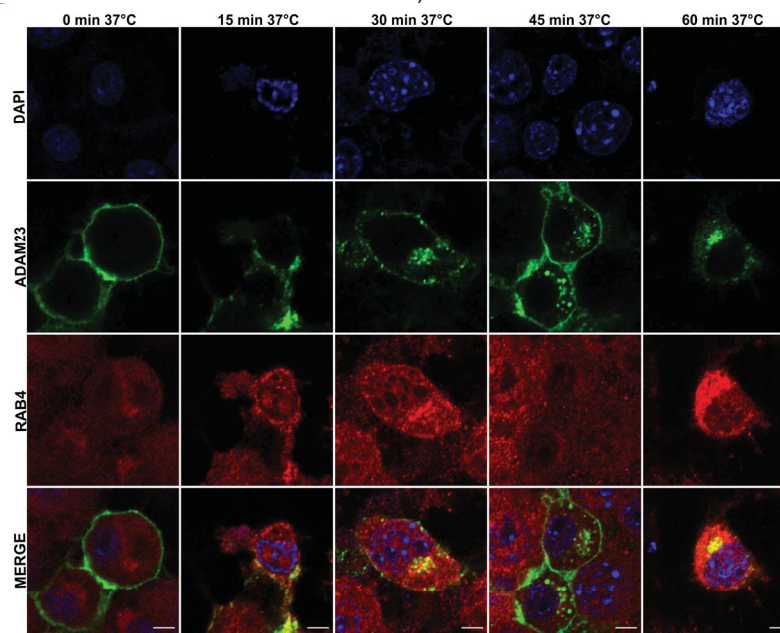
Com base no resultado da internalização de ADAM23 em 40 min. na Figura 24, sugere-se que possa estar ocorrendo uma reciclagem de parte da quantidade de ADAM23 de volta para a membrana e por isso, decidiu-se investigar a co-localização dessa proteína com endossomos de reciclagem. Com o objetivo de avaliar a colocalização de ADAM23 com endossomos de reciclagem, foi feita uma imunofluorescência com marcação para endossomos de reciclagem rápida (que expressam a proteína Rab4) (Figura 31) e lenta (que expressam Rab11) (Figura 32).

Foi possível observar que começa a existir uma fraca co-localização de ADAM23 e endossomo Rab4-positivo em 15 min., sendo que essa co-localização aumenta em 30

min. após o início da internalização. Em 45 min, não foi possível observar co-localização entre ADAM23 e endossomo que expressa Rab4, porém após 60 min é possível ver novamente intensa co-localização entre ADAM23 e esse endossomo Rab4-positivo no citoplasma de células N2A (Figura 31). Essa transitoriedade de co-localização pode ser diferente de uma célula para outra, pois dependendo do metabolismo da célula e da necessidade de mais ADAM23 na membrana, pode haver uma reciclagem mais rápida ou mesmo ausência de reciclagem num dado momento. Isso indica que ADAM23 assim como ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012), passa pela via de reciclagem rápida.

É importante destacar que cargas dependentes de clatrina podem reciclar de volta para a superfície por uma via de reciclagem rápida que requer endossomos Rab4 e Rab35 positivos. Essas cargas podem se mover do endossomo precoce (que expressa o antígeno EEA1) para o compartimento endocítico juxtanclear de reciclagem (ERC), que fica próximo ao núcleo, por um processo que requer nexina 4 seletora de membrana (GRANT & DONALDSON, 2009). Em 60 min. é possível ver co-localização da ADAM23 com endossomo de reciclagem rápida (Rab4-positivo) nessa região juxtanclear.

FIGURA 31 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS DE RECICLAGEM RÁPIDA (RAB4-POSITIVOS).



FONTE: A autora, 2019.

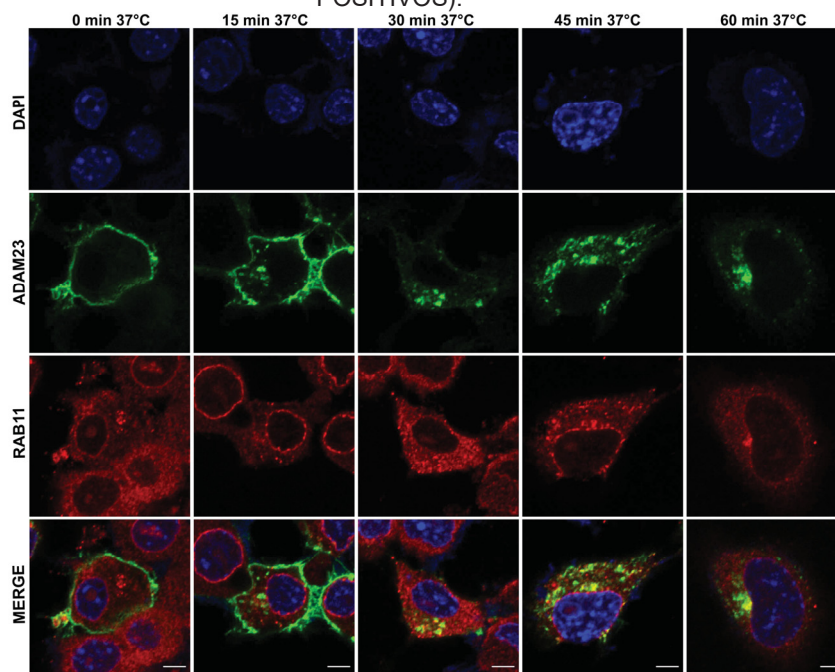
LEGENDA: Ensaio de imunofluorescência feito da mesma forma que na figura anterior. Detalhe da co-localização em pontos de cor amarela na sobreposição das imagens (merge), em 15 min, em 30 min

(quando ocorre uma maior co-localização) e em 60 min. Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram incubadas a 37°C por: 5, 15, 30, 45 e 60 min.. Reações feitas com anti-ADAM23 (DL11C8) e secundário anti-IgG de camundongo Alexa 488 (1:400) e com anti-Rab4 (1:50) e secundário anti-IgG de coelho Alexa 568 (1:400). Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Os cortes utilizados foram de Z=7 a Z=13, sendo cada corte de 0,5 µM. Escala da barra = 5 µm.

Seguindo o mesmo tipo de ensaio de internalização, foi possível observar que em um processo mais lento de reciclagem, existe uma fraca co-localização de ADAM23 e o endossomo de reciclagem tardia (que expressam Rab11) em 30 min., sendo que essa co-localização aumenta em 45 min após o início da internalização. Após 60 min é possível ver também intensa co-localização entre ADAM23 e esse endossomo Rab11-positivo no citoplasma mais especificamente saindo do compartimento endocítico de reciclagem juxtannuclear (ERC), que fica junto ao núcleo e se funde ao endossomo Rab11-positivo (Figura 32).

É interessante lembrar que a partir do ERC, a reciclagem de cargas dependentes ou independentes de clatrina, requer endossomo Rab11 positivo, e a reciclagem de cargas independentes de clatrina envolve a geração de túbulos dependentes de endossomos contendo as proteínas Rab8 e Rab22A (GRANT & DONALDSON, 2009).

FIGURA 32 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM ENDOSSOMOS DE RECICLAGEM LENTA (RAB11-POSITIVOS).



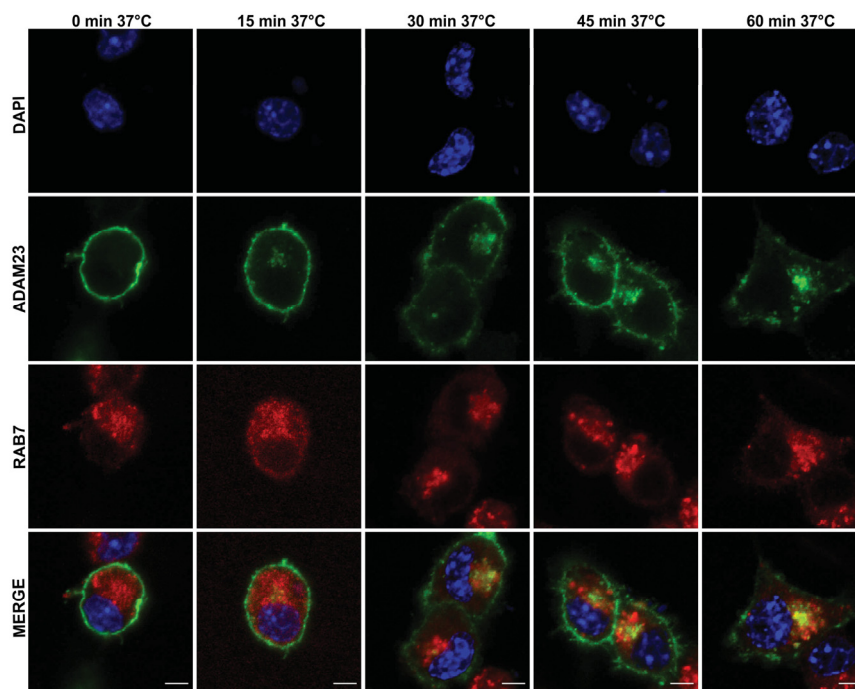
FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Ensaio de imunofluorescência no qual células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram incubadas a 37°C por: 5, 15, 30, 45 e 60 min.. Reações feitas com DL11C8 (anti-ADAM23) e anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (1:400) e com anti-Rab11 (1:25) e secundário anti-IgG de coelho (anti-rabbit) Alexa 568 (1:400). Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Os cortes de 0,5 µm utilizados foram de Z=7 a Z=13. Escala da barra = 5 µm.

Outros ensaios de imunofluorescência foram feitos para comprovar que uma parte da ADAM23 após a passagem pelo endossomo intermediário que expressa a proteína Rab5, pode seguir para o fagossomo Rab7-positivo (Figura 33), que é o compartimento endocítico pré-lisossomal que se funde ao lisossomo LAMP1-positivo. Rab7 é uma proteína marcadora de fagossomo necessária para a formação do fagolisossomo e acidificação (HARRISON *et al.*, 2003).

Ainda não está claro se ADAM23 co-localiza com lisossomo. Entretanto, a passagem de ADAM23 por esse fagossomo que expressa a proteína Rab7 pode sugerir que apesar de a quantidade da proteína ser estável na membrana plasmática por muitas horas (até 72 h após o início da endocitose, Figura 37), uma pequena parte dela pode seguir para a via de degradação lisossomal.

FIGURA 33 – ADAM23 CO-LOCALIZA COM FAGOSSOMOS RAB7-POSITIVOS.



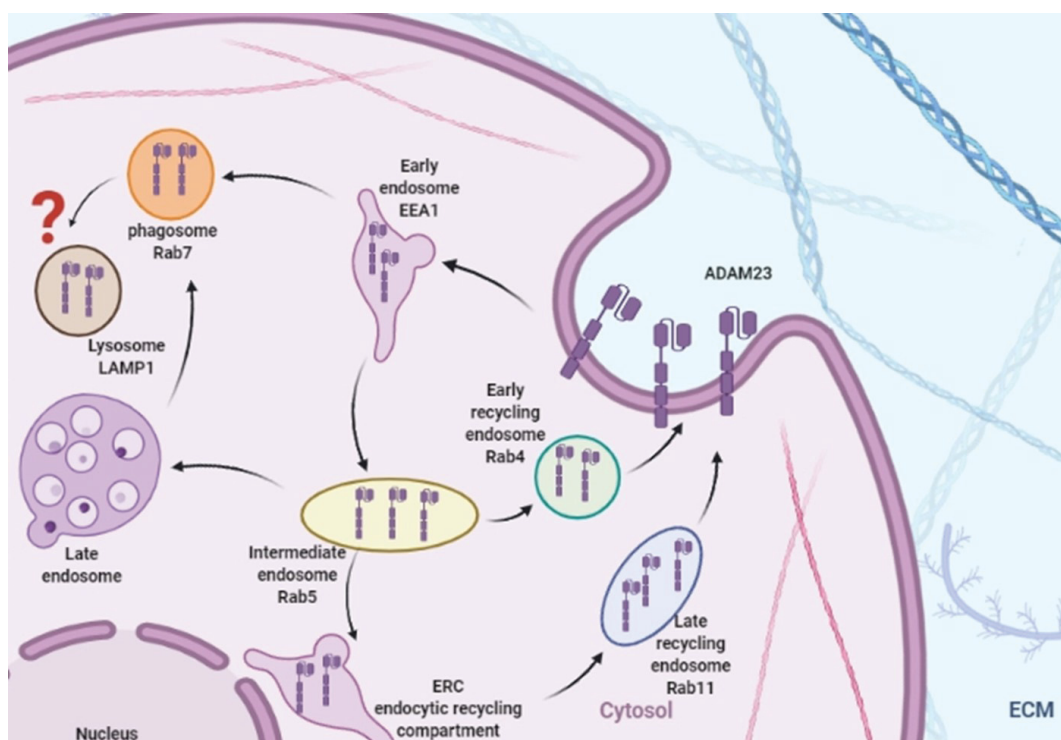
FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram incubadas a 37°C por: 0, 15, 30, 45 e 60 min.. Reações feitas com anti-ADAM23 (DL11C8) e secundário anti-IgG de camundongo (anti-mouse) Alexa 488 (1:400) e com anti-Rab7 (1:50) e secundário anti-IgG de coelho (anti-rabbit) Alexa 568 (1:400). Núcleos marcados com DAPI (1 µg/µl). Os cortes horizontais de cada imagem utilizados foram de Z=7 a Z=13, sendo cada corte de 0,5 µM. Escala da barra = 5 µm.

Com esses resultados pode-se então observar que uma maior quantidade de ADAM23 passa pelo endossomo precoce (que expressa o antígeno EEA1), pelo endossomo intermediário (que expressa a proteína Rab5), pelo endossomo de reciclagem rápida (que expressa Rab4), pelo endossomo de reciclagem lenta (que contém a proteína Rab11), como a ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012). Antes de passar para esse endossomo de reciclagem lenta ADAM23 pode passar pelo ERC, complexo endocítico de reciclagem juxtenuclear, como descrito por Grant e Donaldson (2009). Além disso, uma pequena quantidade (devido à baixa intensidade de co-localização em amarelo nos ensaios de imunofluorescência) da ADAM23 segue para o fagossomo que contém a proteína marcadora Rab7, um pré-cursor do lisossomo.

Essa pequena quantidade que poderia seguir para a via lisossomal pode estar relacionada com a longa estabilidade e duração da ADAM23 na membrana plasmática, sendo que essa característica pode favorecer suas funções de interação com outras moléculas de membrana e favorecer os processos de adesão celular. A via de tráfego intracelular até aqui descrita para a ADAM23 está representada na Figura 34.

FIGURA 34 – INTERNALIZAÇÃO E TRÁFEGO INTRACELULAR DE ADAM23.



FONTE: A autora, 2020.

LEGENDA: Em células N2A, ADAM23 passa pelo endossomo precoce (antígeno EEA1 positivo), pelo endossomo intermediário (que contém a proteína Rab5), pelo endossomo de reciclagem rápida (que contém a proteína Rab4), pelo endossomo de reciclagem lenta (que contém a proteína Rab11) e, em pequena quantidade, pelo fagossomo que contém a proteína marcadora Rab7, um pré-cursor do lisossomo.

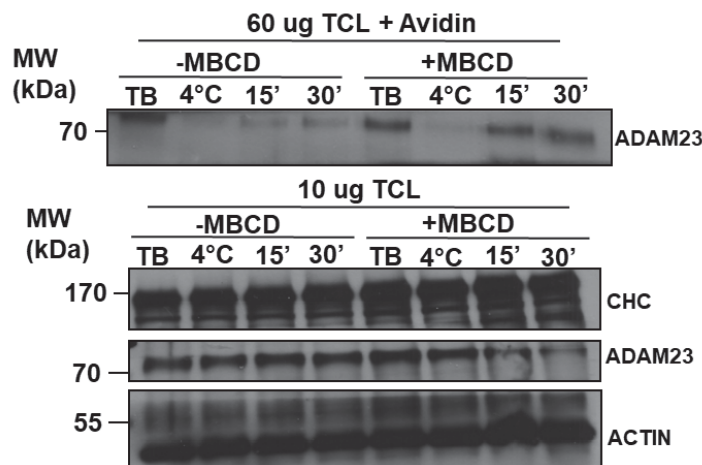
4.9. Ensaio de bloqueio da endocitose de ADAM23.

Com o objetivo de avaliar a inibição da endocitose de ADAM23, células foram tratadas com metil-beta ciclodextrina (M β CD), um inibidor generalista da endocitose por desfazer colesterol de membrana. Alguns estudos dizem que M β CD é um inibidor mais específico da endocitose por cavéola (GUO *et al.*, 2015), outros estudos dizem que ele

inibe as vias de endocitose por clatrina e cavéola (por desfazer as invaginações de cavéola) (RODAL *et al.*, 1999) e, que quando ambas as vias estão bloqueadas, pode haver uma indução (*upregulation*) de endocitose por outras vias independentes de clatrina e cavéola (DAMKE *et al.*, 1995).

Esse inibidor foi escolhido com base nos achados de STAUTZ e colaboradores (2012) envolvendo a internalização de ADAM12 por clatrina e sua inibição com aquele inibidor. O ensaio empregou células tratadas ou não com o inibidor e ensaios de pulso-caça de proteínas biotinizadas e internalizadas. O tempo máximo de internalização avaliado foi de 30 min., pois estudos avaliam a internalização por clatrina ou o bloqueio da mesma entre 20 a 30 min (RODAL *et al.*, 1999; DUTTA *et al.*, 2012; STAUTZ *et al.*, 2012). No grupo tratado com M β CD não foi possível observar uma redução na quantidade de ADAM23 internalizada ao longo do tempo quando comparado com o grupo não tratado com o inibidor como se supunha inicialmente (Figura 35).

De forma contrária, o tratamento com M β CD parece inclusive ter estimulado a internalização de ADAM23, apesar da necessidade de confirmação desse resultado por mais uma série completa de experimentos e de uma análise quantitativa adequada (densitometria de bandas). Para inibir especificamente a via de clatrina deveria ser usada a droga chlorpromazine (HUSSAIN *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de a via da clatrina ser a mais descrita para membros da família ADAM, a ADAM23 pode ser internalizada por mais de uma via, não apenas por clatrina, como ocorre com a ADM17 (LORENZEN *et al.*, 2016).

FIGURA 35 – TRATAMENTO COM 2,5 μ M DE M β CD NÃO INIBIU A ENDOCITOSE DE ADAM23.

FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram tratadas com 2,5 μ M de M β CD, biotiniladas e incubadas para que ocorresse a endocitose a 37°C por: 15 e 30 min. Controles TB: total biotinilado e controle mantido a 4°C por 1 hora. Painel superior: Após esses tempos, foi feita a lise, sendo que 60 ug de cada extrato foram incubados com a resina streptavidina-agarose. Painel inferior: Foram feitos controles da quantidade de massa de proteína aplicada (*inputs*) com 10 ug de proteína de cada extrato antes da incubação com streptavidina-agarose. Foi possível observar que não houve diferença na internalização de ADAM23 entre o grupo tratado e não-tratado com 2,5 μ M de inibidor de endocitose M β CD. Foram feitas marcações nos inputs para cadeia pesada de clatrina (CHC, *clathrin heavy chain*) e para β -Actina como controle da quantidade de massa de proteína analisada e da expressão de clatrina nessa linhagem. Anti-CHC foi usado 1:4.000 e anti-actina 1:10.000.

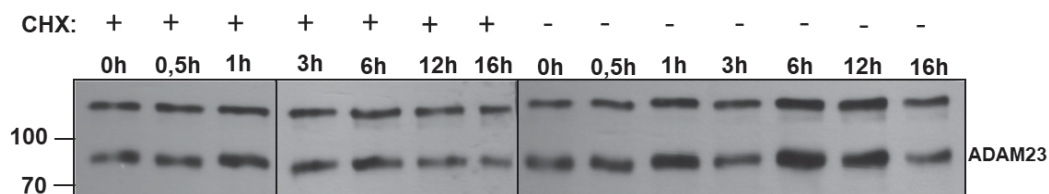
4.10. Ensaios de degradação e estabilidade de ADAM23 na membrana plasmática de N2A.

Com o objetivo de avaliar a estabilidade de ADAM23, células N2A com super-expressão de ADAM23 foram tratadas com cycloheximide para a inibição da síntese protéica e a quantidade de ADAM23 medida em diferentes períodos de tempo. Na Figura 36 é possível observar que não houve um decaimento visível na intensidade da banda de ADAM23 detectável ao longo do tempo com o tratamento com a cycloheximide.

Ainda, qualitativamente não houve diferença nos grupos tratados e não tratados com cycloheximide. A falta de alguns controles, por exemplo, a detecção de proteínas já descritas como pouco estáveis e que deveriam ter sua detecção diminuída com o tempo

ou mesmo o controle de carregamento protéico (e.g. actina ou GAPDH) por condição experimental impedem que maiores conclusões possam ser obtidas.

FIGURA 36 – A QUANTIDADE DE ADAM23 EM N2A É ESTÁVEL MESMO APÓS BLOQUEIO DA SÍNTESE PROTÉICA COM 10 μ M DE CYCLOHEXIMIDE.

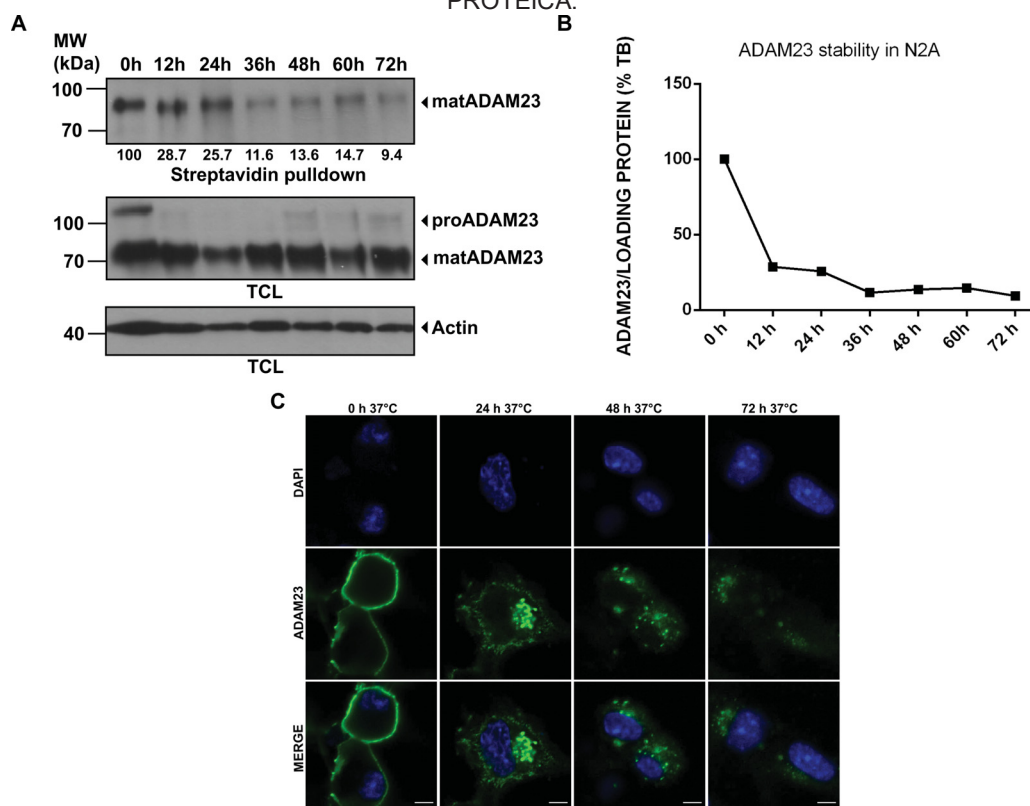


FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 humana (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram tratadas com 10 μ M de inibidor da síntese protéica cycloheximide (CHX, Sigma) por 0; 0,5; 1; 3; 6; 12 e 16h. Foi possível observar que a quantidade de ADAM23 em células N2A parece estável até 16h com ou sem bloqueio de síntese proteica com CHX.

Apesar do ensaio de tratamento com cycloheximide não ser conclusivo, dados obtidos em conjunto com outros membros do grupo (não-mostrados) e os resultados já descritos para outras ADAMs (STAUTZ et al., 2012) levaram a supor que ADAM23 também seja uma proteína razoavelmente estável e com baixa taxa de renovação. Com o objetivo de avaliar a estabilidade de ADAM23 na membrana plasmática das células N2A empregamos a abordagem da derivatização irreversível das proteínas de superfície celular com biotina e a captura e detecção de ADAM23 em diferentes tempos após a marcação com biotina ou pulso de biotina. Na Figura 37 é possível observar que o sinal detectado de ADAM23, inicialmente presente na superfície celular, é estável por pelo menos 72h (em dados não mostrados a ADAM23 biotinilada foi detectada na membrana plasmática após 96h).

FIGURA 37 – ADAM23 PRESENTE NA MEMBRANA PLASMÁTICA TEM LONGA ESTABILIDADE PROTÉICA.



FONTE: A autora, 2019.

LEGENDA: Células N2A transfectadas transientemente com ADAM23 murina (derivada do vetor pCMV6-ADAM23V2-FLAG) foram biotiniladas e incubadas para que ocorresse a endocitose a 37°C por: 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h. (A) Após esses tempos, foi feita a lise, sendo que 15 ug de cada extrato foram incubados com a resina streptavidina-agarose (Painel Superior). Foram feitos controles da quantidade de massa de proteína aplicada (*inputs*) com 15 ug de proteína de cada extrato antes da incubação com streptavidina-agarose (Painel inferior). Foi possível observar que a fração de ADAM23 inicialmente na membrana plasmática permanece estável por até 72h. (B) Gráfico da análise densitométrica das bandas de ADAM23 de 0 a 72h indicando que após esse tempo ainda existe ADAM23 biotinilada não-degradada em N2A. (C) Estabilidade de ADAM23 por imunofluorescência com células N2A transfectadas com ADAM23 incubadas a 37°C por: 0, 24, 48 e 72 h. Reações foram feitas com anti-ADAM23 (sobrenadante DL11C8) e anti-IgG de camundongo Alexa 488 (1:400). Núcleos foram marcados com DAPI (1 µg/µl). Os cortes horizontais de cada imagem utilizados foram de Z=7 a Z=13, sendo cada corte de 0,5 µm. Escala da barra = 5 µm.

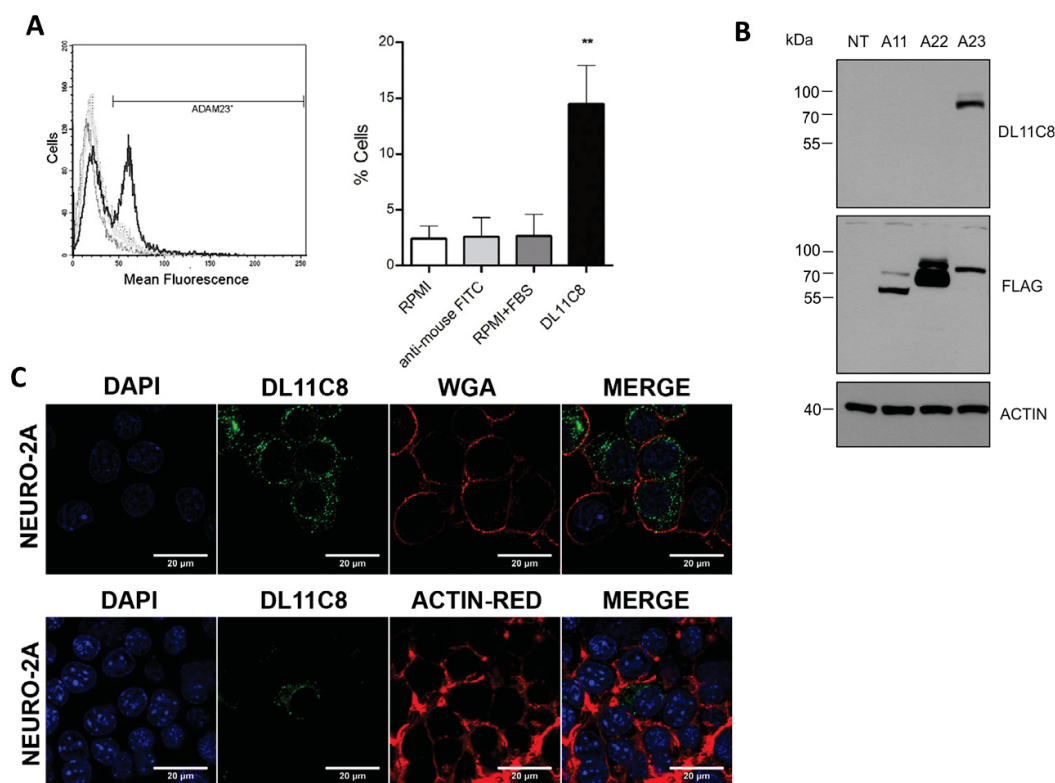
4.11. Ensaios da especificidade do anticorpo anti-ADAM23 (DL11C8).

O anticorpo DL11C8 foi testado em relação à sua capacidade de reagir com a ADAM23 endogenamente expressa em amostras murinas e humanas por citometria de fluxo (Figura 38A) e imunofluorescência (Figura 38C) ou com a ADAM23 superexpressa em células HEK293T por *western blotting* (Figura 38B) (BORGONOVO *et al.*, 2018). Por citometria de fluxo, o monoclonal DL11C8 marcou cerca de 15% das células de neuroblastomas murinos Neuro-2a (Figura 38A), enquanto uma marcação residual foi observada em diferentes controles negativos (ausência de anticorpo primário e meio de cultura contendo ou não 10% de soro fetal bovino).

Por meio de microscopia confocal foi observado que DL11C8 reagiu com ADAM23 na membrana plasmática (Figura 38C, painel superior, dupla marcação com WGA (lectina de membrana)) e no espaço citoplasmático perinuclear com um padrão de marcação puntiforme (Figura 38C, painel inferior, dupla marcação com F-actina de citoplasma). Tal padrão de marcação é compatível com os dados previamente publicados pelo nosso grupo (COSTA *et al.*, 2009) e outros (CAL *et al.*, 2000; GOLDSMITH *et al.*, 2004).

No conjunto esses resultados indicam que o monoclonal DL11C8 especificamente reconhece ADAM23 poderá ser largamente utilizado como uma ferramenta molecular no estudo da expressão e função de ADAM23 sob diferentes abordagens experimentais.

FIGURA 38 – O ANTICORPO ANTI-ADAM23 (DL11C8) TEM ESPECIFICIDADE PARA ADAM23 EM LINHAGEM NEURO-2A E 293T.



FONTE: A autora, 2018 inseridas no artigo de BORGONOVO *et al.*, 2018.

LEGENDA: **(A)** Especificidade pela ADAM23 endógena da membrana plasmática de células N2A demonstrada por FACS. **(B)** Especificidade do anti-ADAM23 (DL11C8) apenas pela ADAM23 superexpressa em células 293T quando comparada com as ADAMs 11 e 22 superexpressas nessa mesma linhagem celular. **(C)** Especificidade pela ADAM23 do citoplasma (marcação da actina do citoplasma com actin-red, 1:300) e da membrana plasmática (marcação de lectina de membrana plasmática com WGA, 1:300) em células N2A. Anticorpo secundário utilizado contra o anti-ADAM23 foi anti-IgG de camundongo Alexa 488 nm (verde, 1:800). Escala da barra= 20 μm.

4.12. Avaliação das formas de ADAM23 em células N2A tratadas com inibidor de furina.

Com o objetivo de avaliar o efeito do inibidor de furina sobre as formas de ADAM23 expressas em N2A foram realizados dois testes. O primeiro consistiu em 4 grupos de células N2A: um grupo não tratado (controle negativo), um grupo tratado com inibidor de furina (controle positivo) sendo que ambos mostravam as formas de ADAM23 de forma

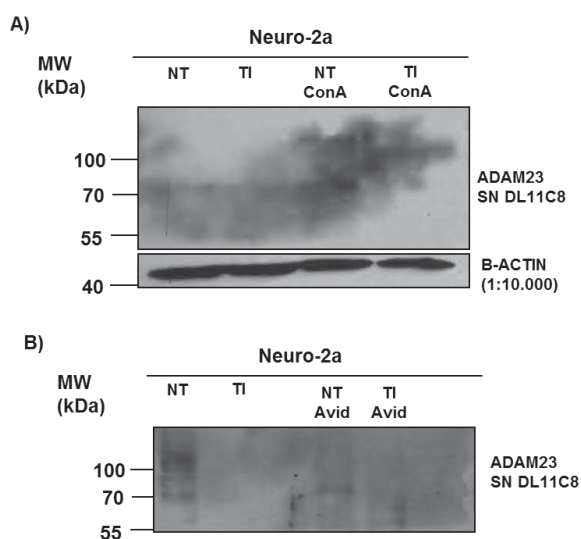
não enriquecida e outros dois grupos iguais a esses porém enriquecidos em glicoproteínas por concanavalina A-Sepharose (Figura 39A).

Sabe-se que as pró-proteínas convertases do tipo furinas atuam no processamento das ADAMs (LUM *et al.*, 1998; ENDRES *et al.*, 2003) e que o enriquecimento por conA é um método eficiente para a identificação de ambas as formas da ADAM23, processada de 70 kDa e não-processada de 100 kDa, independentemente de estarem no citoplasma ou na superfície celular (GOLDSMITH *et al.*, 2004). Nesse caso, quando as amostras foram enriquecidas com conA, foram observadas ambas as formas de ADAM23 no grupo não-tratado com inibidor de furina, e aparentemente, apenas a forma de 100 kDa foi vista no grupo tratado com inibidor de furina (Figura 39A, linha 4), indicando que o inibidor de furina, realmente inibe a clivagem/processamento da pró-forma da ADAM23 (100 kDa) (Figura 39A).

Para avaliar o impacto do tratamento com furina no processamento e presença das duas formas de ADAM23 na membrana plasmática, após o tratamento com inibidor as proteínas presentes na superfície celular foram marcadas com biotina e precipitadas com avidina-agarose (Figura 39B). ADAM23^{70kDa} foi detectada apenas no grupo não-tratado com o inibidor, indicando que a inibição de furinas impede a conversão proteolítica de ADAM23^{100kDa} em ADAM23^{70kDa} (Figura 39B). Entretanto, não se pode excluir a possibilidade que alguma ADAM23^{100kDa} ainda esteja presente na membrana plasmática, embora não possa ser detectada nestas condições experimentais.

Ainda, esperava-se um aumento na forma de ADAM23^{100kDa} concomitante à diminuição da forma de ADAM23^{70kDa} já que o inibidor deveria inibir a conversão a forma de 100 kDa em 70 kDa. De fato resultado semelhante ao nosso já foi observado por outro grupo (GOLDSMITH *et al.*, 2004), o qual argumenta que provavelmente ADAM23^{100kDa} é instável na membrana plasmática e é rapidamente degradada, não sendo assim detectada.

FIGURA 39 – CÉLULAS N2A TRATADAS COM INIBIDOR DE FURINA NÃO APRESENTAM OU APRESENTAM EM QUANTIDADE REDUZIDA A FORMA DA ADAM23 DE 70 KDA.



FONTE: A autora, 2018.

LEGENDA: **MW:** peso molecular (*molecular weight*). **A)** Grupos tratados e não tratados com inibidor de furina, enriquecidos ou não com concanavalina A-sepharose. **B)** Grupos tratados e não tratados com inibidor de furina, biotinilados ou não para as formas de ADAM23 da superfície celular.

5. DISCUSSÃO

O anticorpo monoclonal anti-ADAM23 (obtido a partir do sobrenadante do hibridoma DL11C8) especificamente reconhece ADAM23 expressa em diferentes espécies e em diferentes tipos celulares através de sua ligação ao domínio rico em cisteína (BORGONOV *et al.*, 2018), podendo ser largamente utilizado como uma ferramenta molecular no estudo da expressão e função de ADAM23. Esse anticorpo se liga especificamente aos domínios desintegrina e cisteína da ADAM23.

Os dados até aqui obtidos sugerem que uma parte da ADAM23 seja internalizada pela via dependente de clatrina e em seguida, segue para os endossomos precoces e os de reciclagem como a ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012). ADAM23 não possui atividade proteolítica, pois essa proteína não contém o domínio altamente conservado de ligação ao zinco como observado para 25 dentre 40 membros da família ADAM (LU *et al.*, 2010) e ausente também na ADAM29 (BROCKER *et al.*, 2009) e na ADAM22 (LIU *et al.*, 2009). Portanto, essa característica particular parece não influenciar diretamente o processo de internalização.

A ausência de atividade proteolítica pode sugerir que a ADAM23 assim como a ADAM22 (LIU *et al.*, 2009) atua como receptor de adesão neural nas sinapses neurais e/ou como receptor pós-sináptico de moduladores de neurotransmissores como LGI1 e LGI4 nessas sinapses, uma vez que, já se sabe que ADAM22 e ADAM23 atuam no transporte axonal de LGI1 (HIVERT *et al.*, 2019). ADAM23 tem uma cauda citoplasmática curta sem o sítio *PxxP* de ligação aos domínios SH3, assim, nesse caso a cauda possivelmente não seja essencial para a correta internalização.

Pode-se especular que o domínio citoplasmático de ADAM23 poderia interagir com uma proteína que contém ou o sítio de ligação a SH3 ou o próprio domínio SH3. Assim, ADAM23 poderia interagir com outra proteína que é capaz de se ligar a Grb2 ou outra proteína adaptadora relacionada à endocitose dependente de clatrina. De fato, já foi demonstrado que ADAM12, a qual possui o sítio de ligação ao domínio SH3, se liga a Grb2, uma proteína adaptadora, induzindo a endocitose através de vesículas revestidas de clatrina (STAUTZ *et al.*, 2012). Neste contexto, mostra-se relevante a investigação mais detalhada do papel de ADAM23 no transporte de seus parceiros moleculares durante a endocitose e tráfego intracelular.

Com relação aos parceiros moleculares de ADAM23, já foi descrito que ADAM23 e ADAM22 co-localizam com LGI1 em vesículas de transporte axonal através do citoplasma de neurônios hipocâmpais (HIVERT *et al.*, 2019). Também está demonstrado que ADAM23 interage com PrPc na superfície celular (COSTA *et al.*, 2009), sugerindo assim que ADM23 possa estar envolvida na endocitose e no tráfego intracelular de PrPc, como uma proteína de transporte. PrPc é residente de *lipid rafts* na membrana plasmática (KESHET *et al.*, 2000; TAYLOR & HOOPER, 2006; WATT *et al.*, 2014). ADAM23 transita entre regiões de *rafts* e regiões não-*rafts* na superfície de neurônios primários cultivados, sugerindo também que a presença da ADAM23 em determinados microambientes da membrana possa estar envolvida na transdução de sinal na superfície neuronal (BORGONOVO *et al.*, 2018).

Para estudar a internalização de ADAM23, foi usado neste trabalho um ensaio de biotilação de proteínas de superfície celular de neuroblastomas transientemente transfectados com ADAM23. Ainda não está claro quais vias de internalização são utilizadas pela ADAM23, mas como a ADAM23 entra e sai dos domínios de lipid rafts, ela pode utilizar tanto a via da clatrina, fora dos rafts como a via da cavéola a partir dos rafts. Além disso, para outras ADAMs como a ADAM17 a via de internalização por clatrina, apesar de ser a mais comum, não é a única utilizada (LORENZEN *et al.*, 2016).

O presente trabalho mostra que ADAM23 foi constitutivamente internalizada em até 1 hora, e que ADAM23 inicialmente presente na membrana plasmática permaneceu estável por até 72h sugerindo uma baixa taxa de renovação. Se esta fração de ADAM23 derivatizada com biotina na superfície celular permanece residente na membrana plasmática por todo este período, é internalizada, armazenada ou enviada de volta para a superfície externa, isto é, reciclada, merece investigação mais aprofundada. A permanência da ADAM23 na membrana por tanto tempo, pode estar relacionada com a permanência da mesma na membrana ou com frequência de reciclagens que a proteína marcada com biotina sofre sendo levada constantemente de volta para a membrana e com a importância do seu papel na interação com as integrinas e com a matriz extracelular no processo de adesão celular.

Após o início da internalização, ADAM23 co-localizou com ambos endossomos precoce e de reciclagem, sugerindo que a mesma pode ser rapidamente transportada de volta para a membrana pela via do endossomo Rab4-positivo ou mais lentamente pela via do endossomo Rab11-positivo, ou ainda, ser levada para a via trans-Golgi num transporte

retrógrado (HSU & PREKERIS, 2010). A partir do ensaio com a marcação com anti-ADAM23, a ADAM23 pareceu ser rapidamente (menos de 1 h) internalizada. A reciclagem de ADAM23 através de ambos os endossomos de reciclagem rápida (que expressam a proteína Rab4) e lenta (que expressam Rab11) pode ter a ver com duração e estabilidade da quantidade de proteína ADAM23 na superfície celular. Como a ADAM23 assim como ADAM12 (STAUTZ *et al.*, 2012), também passa pela via de reciclagem lenta, existe a possibilidade de que as demais desintegrinas da família ADAM sigam trajetos de reciclagem rápida por endossomos Rab4-positivos e lenta por endossomos Rab11-positivos.

Além disso, a passagem de ADAM23 pela via pré-lisossomal através do fagossomo Rab7-positivo foi vista por ensaios de imunofluorescência. Isso pode sugerir que apesar de a quantidade da proteína ser estável na membrana plasmática por muitas horas (até 72 h após o início da endocitose), uma pequena parte dela pode seguir para a via de degradação lisossomal.

Os mecanismos de internalização das ADAMs ainda devem ser melhor investigados. Endocitose é um mecanismo necessário para regular a quantidade e distribuição de proteínas sinápticas (EHLERS, 2000), e alterações da endocitose mediada por clatrina estão envolvidas em muitas doenças humanas (MCMAHON & BOUCROT, 2011). A internalização é de fato um mecanismo que regula os níveis de ADAM23 na superfície celular. Sabe-se que a ADAM23 é um membro da família ADAM amplamente expresso no sistema nervoso central, em neurônios, células granulares cerebelares e células de Schwann do sistema nervoso periférico (SAGANE *et al.*, 1998; SAGANE *et al.*, 1999; GOLDSMITH *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008; OWUOR *et al.*, 2009; DHAUNCHAK *et al.*, 2010; MARKUS *et al.*, 2011; KEGEL *et al.*, 2014).

ADAM23 tem papel patológico no câncer, pois o seu gene está silenciado pela hipermetilação do promotor em tumores gástricos, de mama, cérebro e pulmão (COSTA *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2005; TAKADA *et al.*, 2005; VERBISCK *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2011). Também está demonstrado que a ADAM23 tem um papel no desenvolvimento e manutenção do sistema nervosa, a falta dessa proteína em camundongo leva a tremores severos, ataxia e morte precoce nos primeiros dias após o nascimento (MITCHELL *et al.*, 2001; OWUOR *et al.*, 2009; KEGEL *et al.*, 2014). A regulação da expressão de ADAM23 na membrana e o processo de endocitose e reciclagem da ADAM23 dessas células também podem estar relacionados à severidade dessas condições clínicas.

Ainda não está claro se a internalização de parte da ADAM23 ocorre apenas pela via dependente de clatrina. Como o grupo tratado com M β CD não foi possível observar uma redução na quantidade de ADAM23 internalizada ao longo do tempo, o tratamento com M β CD parece ter estimulado a internalização de ADAM23. Como M β CD não é um bloqueador exclusivo da via de clatrina, sugere-se o uso de chlorpromazine (HUSSAIN *et al.*, 2011), um inibidor exclusivo da endocitose por clatrina. Além disso, sugere-se também o uso de drogas específicas para bloquear também a endocitose por cavéola a partir dos rafts. Paralelamente, o estudo de uma via de internalização que não dependa de clatrina ou cavéola merece investigação.

É importante lembrar que a endocitose pode ocorrer independentemente de clatrina e cavéola de maneira dependente de colesterol, implicando em rotas endocíticas que requerem composições de lipídeos específicos. Esse tipo de endocitose dependente de microdomínios internaliza fluidos extracelulares, vírus SV40, a subunidade B da enterotoxina colérica (CTxB), o glicosíngolípídeo gangliosídeo (GM1), outros esfingolípídeos (SLs), e proteínas GPI-ancoradas assim como receptores de IL-2, hormônios de crescimento, AMF, endotelina e outras moléculas (DOHERTY & MCMAHON, 2009).

Proteínas que se ligam a membranas por âncora de GPI são enriquecidas em frações de membrana resistentes a detergentes e não estão normalmente concentradas em vesículas revestidas de clatrina (*clathrin coated pits*, CCPs) ou cavéola. Elas são endocitadas por uma via dependente de colesterol e independente de clatrina. A internalização dessas proteínas é cineticamente distinta da captação ou *uptake* de proteínas transmembranas e pode pular a passagem pelos compartimentos endocíticos Rab5-positivos. Tal via, que entrega carga para endossomos chamados compartimentos endossomais precoces enriquecidos em proteínas ancoradas a GPI-GPIAP (GEECs), é aparentemente regulada pela proteína G cdc42 e não é inibida pela superexpressão de proteínas dinamina dominante-negativas que inibem a endocitose mediada por clatrina. Tal compartimento tubulovesicular ácido parece ser responsável por uma grande proporção de marcadores de fase fluida internalizados (DOHERTY & MCMAHON, 2009). Como a ADAM23 se liga a PrPc na superfície celular (COSTA *et al.*, 2009), pode ser possível que uma parte da ADAM23 também seja internalizada por uma rota independente de clatrina e cavéola, como a rota dos endossomos enriquecidos em GPI (GEECs).

O recrutamento de proteínas GPI-ancoradas nessas estruturas endocíticas é dependente da quantidade de GPI, mas não se sabe ao certo como isso é regulado apesar da ativa manutenção de agrupamentos em nanoescala dessas proteínas na superfície celular que são dependentes do colesterol de membrana. Uma hipótese recente que incorpora a quiralidade e a inclinação intrínseca das moléculas dentro desse agrupamento sugere que apenas os constituintes da membrana são suficientes para a brotação da membrana. A produção de alta curvatura de membrana nesse sentido pode permitir a proteínas celulares que detectam a sinalização e geram curvatura de membrana, como proteínas que possuem o domínio BAR, dinamina (embora ela não tenha sido encontrada em intermediários endocíticos GEEC), e os seus homólogos funcionais a induzir a geração de mais curvatura para produzir estruturas tubulares/vesiculares que são então entregues aos compartimentos endossomais GEECs, assim como a induzir a cisão final de tais invaginações a partir da membrana plasmática (DOHERTY & MCMAHON, 2009).

Outro tipo de internalização independente de clatrina e cavéola são dependentes de flotilina 1 e 2, e as cargas levadas para as vesículas são CTxB, CD59 e proteoglicanas. Nesse caso não se sabe a endocitose depende de proteína G. Outras formas de endocitose são a fagocitose e a macropinocitose. A fagocitose transporta patógenos e remanescentes da apoptose e envolve as proteínas Arf6, cdc42, rac1 e rhoA e envolve actina, anifisina 1 e dinamina. Já a macropinocitose transporta marcadores de fase fluida e RTKs, envolve proteína G, Rac1, actina, PI3K, Ras e Src, além de proteínas com domínios BAR/CtBP1 (proteína 1 ligante de região C-terminal ou *C-terminal-binding protein 1*) que são substratos na cisão a partir da membrana plasmática. Entretanto, não está claro se a macropinocitose envolve dinamina (DOHERTY & MCMAHON, 2009).

ADAM23 é conhecida por interagir com integrinas de superfície celular $\alpha_v\beta_3$ promovendo a adesão celular de neuroblastomas e astrocitomas (CAL *et al.*, 2000). A desadesão celular, quando bem regulada, é um importante mecanismo que permite a migração e o deslocamento celular. Entretanto, quando desregulada, como corre no câncer, pode promover metástase. Também já se sabe que a ADAM23 negativamente modula a ativação na superfície celular da integrina $\alpha_v\beta_3$ durante a metástase (VERBISCK *et al.*, 2009). Esta rota de reciclagem de volta para a membrana pode ser importante para as interações da ADAM23 com integrinas $\alpha_v\beta_3$ e destas com a matriz extracelular. O processo de reciclagem da ADAM23 desregulado pode estar relacionado a

níveis aumentados de desadesão/desprendimento celular e metástase. Esses mecanismos ainda devem ser melhor investigados e esclarecidos.

Sabe-se que integrinas são internalizadas por endocitose dependente de clatrina ou caveolina e podem transitar para a degradação lisossomal ou serem recicladas de volta para a membrana plasmática (DE FRANCESCHI *et al.*, 2015). O tráfego de integrinas está relacionado com a regulação das propriedades tumorais adesivas e migratórias (PAUL *et al.*, 2015). Vários reguladores da endocitose da integrina $\beta 1$ foram identificados, como a proteína nexina seletora 17 (do inglês, *sorting nexin 17*, SNX17) que se liga à integrina $\beta 1$ nos endossomos precoces e dá suporte à sua reciclagem (BOTTCHEER *et al.*, 2012) e a proteína seletora de carga GGA3 (do inglês, *Golgi-localized γ -ear-containing Arf-binding (GGA)3*) cujo papel é divergir a integrina $\beta 1$ integrin de uma via de degradação, consequentemente mantendo a estabilidade da integrina, a adesão focal e a migração celular (RATCLIFFE *et al.*, 2016).

Considerando-se a integrina $\beta 3$ sabe-se também que a mesma se liga à proteína adaptadora de clatrina Dab2 durante a endocitose, cuja regulação do tráfego está relacionada aos processos celulares de proliferação, invasão e metástase nas seguintes doenças: câncer epitelial de ovário, câncer de próstata, carcinoma de nasofaringe, câncer de mama, câncer de pulmão (MOK *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2002; TONG *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2014; DE FRANCESCHI *et al.*, 2015).

Após a internalização $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_v\beta_3$ entram no compartimento perinuclear de reciclagem (PNRC, do inglês, *perinuclear recycling compartment*) e são lentamente recicladas de volta à membrana plasmática de forma dependente de Rab11 e PKB/Akt. A integrina $\alpha_v\beta_3$, também pode passar pela via de reciclagem rápida do endossomo Rab4, uma vez que, a estimulação com o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF, do inglês, *platelet-derived growth factor*), direciona a integrina $\alpha_v\beta_3$, mas não a $\alpha_5\beta_1$, para o endossomo Rab4 envolvendo a associação da $\alpha_v\beta_3$ com a quinase PKC (PRKD1, do inglês, *PKC-related kinase PKD1*) (WOODS *et al.*, 2004).

O estímulo com PDGF induz a fosforilação do efetor de Rab5 (rabaptin-5) mediada por PKD1 e a subsequente formação do complexo rabaptina-5–Rab5–Rab4 (CHRISTOFORIDES *et al.*, 2012). Esse complexo induz a entrega da integrina $\alpha_v\beta_3$ na superfície de células migratórias para a migração celular persistente e um modo de invasão dependente de $\alpha_v\beta_3$ em microambientes contendo baixos níveis de fibronectina (CHRISTOFORIDES *et al.*, 2012). Considerando que a ADAM23 se liga à integrina $\alpha_v\beta_3$ e

também co-localiza com as vesículas endocíticas positivas para EEA1, Rab5, Rab4 e Rab11, pode ser possível que ambas as proteínas internalizem juntas de forma dependente de clatrina.

A internalização e reciclagem da integrina $\beta 1$ por sua vez é importante para a manutenção dos níveis de $\beta 1$ na superfície celular e eventos de adesão e migração celular (DE FRANCESCHI *et al.*, 2015). Outras abordagens usando marcação de proteínas de superfície com biotina, mostraram que o silenciamento (ou *knockdown*) de ADAM9 em células PC3 e em fibrosarcoma causou redução da internalização constitutiva de $\beta 1$, um subsequente atraso na degradação lisossomal, alteração na adesão focal e formação de fibras de estresse nessas células silenciadas para ADAM9 (ROBERTS *et al.*, 2001; MYGIND *et al.*, 2018).

O mesmo trabalho mostrou que a reciclagem da integrina $\beta 1$ não foi afetada com o silenciamento de ADAM9, sendo ADAM9 um regulador da endocitose da integrina $\beta 1$. O mesmo estudo mostrou que a ADAM9 se submete a uma internalização constitutiva dependente de clatrina com cinética de internalização similar à da integrina $\beta 1$, sugerindo que ambas as proteínas co-internalizam (MYGIND *et al.*, 2018).

ADAM9 também foi demonstrada regulando o tráfego intracelular da proteína E-caderina (HIRAO *et al.*, 2006) e ADAM12 foi observada co-localizando com o receptor 2 de TGF β (ATFI *et al.*, 2007). Essas informações podem indicar que as proteínas ADAMs podem ter um papel regulatório durante a endocitose, sugerindo que a internalização de ADAM23 pode ocorrer via clatrina e junto com seus parceiros moleculares como $\alpha_v\beta_3$, PrPc, LGI1 ou LGI4.

A reciclagem de volta à membrana plasmática pode ser importante para as interações de ADAM23 com a integrina $\alpha_v\beta_3$ e nos processos de adesão celular. A desregulação do processo de reciclagem de ADAM23 pode estar relacionada com altos níveis de desadesão/desprendimento, metástase, epilepsia ou outras severidades clínicas. Esses mecanismos ainda devem ser detalhadamente investigados.

6. CONCLUSÕES

- O monoclonal DL11C8 foi adequado e específico para reconhecer a ADAM23 na membrana e no citoplasma de células N2A;
- Em células de neuroblastoma murino (N2A) transfectadas, ADAM23 é constitutivamente internalizada em 15 min, sendo que a internalização continua até 60 min;
- Em até 1 hora é possível observar por imunofluorescência que a ADAM23 se desloca da membrana plasmática para o citoplasma, e a presença de ADAM23 no citoplasma aumenta com o tempo de internalização;
- Parte da ADAM23 da membrana plasmática é possivelmente internalizada via clatrina;
- ADAM23 co-localiza com endossomos precoces EEA1-positivos;
- ADAM23 foi observada dentro de endossomos de reciclagem rápida (Rab4-positivos);
- Houve co-localização da ADAM23 com endossomos de reciclagem lenta (Rab11-positivos);
- Uma pequena quantidade de ADAM23 passa pelo fagossomo Rab7-positivo.
- ADAM23 marcada por biotilação na membrana plasmática é estável por até 72h a 37°C. Ou seja, ADAM23 parece ter uma baixa taxa de renovação;
- O tratamento de células com methyl- β -cyclodextrin, diferentemente do que ocorreu para ADAM12, não inibiu a internalização de ADAM23 nas condições experimentais aqui descritas;
- Existe uma diferença entre o domínio transmembrana e a cauda citoplasmática das ADAM23 V1 e V2 do vetor pCMV6 da Origene. Sendo que a forma V2 consegue gerar a ADAM23 de 100 e 70 kDa, enquanto que a forma V1 só consegue gerar a forma de 100 kDa sem processamento da proteína. A cauda citoplasmática parece ter uma função no processamento da ADAM23 ainda não descrita;

7. PERSPECTIVAS

Dentre as perspectivas estão a confirmação da internalização de ADAM23 por clatrina através de RNAi e por outras vias como cavéola, pois a principal via de internalização a partir dos *lipid rafts* da membrana plasmática é por cavéola. Então, pode ser que fora dos *rafts* a ADAM23 entre por cavéola e dentro dos *rafts* ela seja internalizada via cavéola. Seria interessante investigar se a ADAM23 internaliza através de alguma proteína adaptadora que se liga à clatrina como Grb2. Como ADAM23 tem uma cauda citoplasmática curta sem o sítio PxxP de ligação aos domínios SH3, a cauda não é essencial para a correta internalização. Por isso é importante investigar se o domínio citoplasmático de ADAM23 interage com uma proteína que contém ou o sítio de ligação a SH3 ou o próprio domínio SH3.

A ADAM23 pode interagir com outra proteína que é capaz de se ligar a Grb2 ou outra proteína adaptadora relacionada à endocitose dependente de clatrina. Além disso, é importante avaliar as imagens de endocitose da ADAM23 com marcações para o lisossomo (LAMP1-positivo) e determinar se parte da ADAM23 segue para a via de degradação lisossomal. Outro ponto a ser investigado é se ADAM23 participa do transporte de outras moléculas durante a internalização. Já se sabe que ADAM23 se liga a PrPc, LGI1 e LGI4, participando do transporte citoplasmático retrógrado dessa última molécula. Com base nessas informações seria interessante avaliar se ADAM23 atua como um transportador dessas moléculas durante a internalização, reciclagem ou através do citoplasma. Esses ensaios não puderam ser realizados por motivos financeiros na obtenção de reagentes como RNAi de clatrina, como o inibidor específico da endocitose por clatrina (chlorpromazine), anticorpos contra IgG de coelho anti-clatrina, anti-cavéola, anti-LAMP1 e anti-Grb2.

Seria interessante investigar se a regulação da quantidade de ADAM23 na membrana e o processo de endocitose e reciclagem da ADAM23 em determinadas células também podem estar relacionados à severidade de algumas doenças como Alzheimer, epilepsia e alguns tipos de câncer. Também seria importante investigar se o processo de reciclagem da ADAM23 desregulado pode estar relacionado a níveis aumentados de desadesão/desprendimento celular e metástase em neuroblastomas e astrocitomas. Ainda é necessário vincular a regulação da endocitose da ADAM23 com determinadas condições clínicas.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHTSEN, R., *et al.* Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity. **Experimental Cell Research**, v. 317. n. 2, p. 195-209, 2011.
- ANDERSON, R. G. The caveolae membrane system. **Annu Rev Biochem**, v. 67. p. 199-225, 1998.
- ATFI, A., *et al.* The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor. **J Cell Biol**, v. 178. n. 2, p. 201-208, 2007.
- BARRAL, D. C., *et al.* CD1a and MHC class I follow a similar endocytic recycling pathway. **Traffic**, v. 9. n. 9, p. 1446-1457, 2008.
- BEATTIE, E. C., *et al.* Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. **Nat Neurosci**, v. 3. n. 12, p. 1291-1300, 2000.
- BENMERAH, A.; LAMAZE, C. Clathrin-Coated Pits: Vive La Différence? **Traffic**, v. 8. n. 8, p. 970-982, 2007.
- BIASINI, E., *et al.* Prion protein at the crossroads of physiology and disease. **Trends in Neurosciences**, v. 35. n. 2, p. 92-103, 2012.
- BLANPIED, T. A.; SCOTT, D. B.; EHLERS, M. D. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. **Neuron**, v. 36. n. 3, p. 435-449, 2002.
- BOILLLOT, M., *et al.* LGI1 acts presynaptically to regulate excitatory synaptic transmission during early postnatal development. **Sci Rep**, v. 6. p. 21769, 2016.
- BORGONOVO, Z. L. M., *et al.* Monoclonal Antibody DL11C8 Identifies ADAM23 as a Component of Lipid Raft Microdomains. **Neuroscience**, v. 384. p. 165-177, 2018.
- BOTTCHER, R. T., *et al.* Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail. **Nat Cell Biol**, v. 14. n. 6, p. 584-592, 2012.
- BROCKER, C. N.; VASILIOU, V.; NEBERT, D. W. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. **Hum Genomics**, v. 4. n. 1, p. 43-55, 2009.
- BROWN, F. D., *et al.* Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Arf6-regulated membrane traffic. **J Cell Biol**, v. 154. n. 5, p. 1007-1017, 2001.
- CAL, S., *et al.* ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11. n. 4, p. 1457-1469, 2000.
- CAL, S., *et al.* ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alpha v beta 3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11. n. 4, p. 1457-1469, 2000.
- CARROLL, R. C., *et al.* Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. **Nat Neurosci**, v. 2. n. 5, p. 454-460, 1999.
- CASWELL, P. T.; NORMAN, J. C. Integrin trafficking and the control of cell migration. **Traffic**, v. 7. n. 1, p. 14-21, 2006.
- CAYROL, F., *et al.* Integrin alphavbeta3 acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. **Blood**, v. 125. n. 5, p. 841-851, 2015.

- CHEN, C. C., *et al.* RAB-10 is required for endocytic recycling in the *Caenorhabditis elegans* intestine. **Mol Biol Cell**, v. 17. n. 3, p. 1286-1297, 2006.
- CHENG, Z. J., *et al.* Membrane microdomains, caveolae, and caveolar endocytosis of sphingolipids. **Mol Membr Biol**, v. 23. n. 1, p. 101-110, 2006.
- CHOUDHURY, A., *et al.* Elevated endosomal cholesterol levels in Niemann-Pick cells inhibit rab4 and perturb membrane recycling. **Mol Biol Cell**, v. 15. n. 10, p. 4500-4511, 2004.
- CHRISTOFORIDES, C., *et al.* PKD controls α v β 3 integrin recycling and tumor cell invasive migration through its substrate Rabaptin-5. **Dev Cell**, v. 23. n. 3, p. 560-572, 2012.
- CISSE, M. A., *et al.* The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. **J Biol Chem**, v. 280. n. 49, p. 40624-40631, 2005.
- COSTA, F. F., *et al.* ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience Letters**, v. 380. n. 3, p. 260-264, 2005.
- COSTA, F. F., *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23. n. 7, p. 1481-1488, 2003.
- COSTA, F. F., *et al.* Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23. n. 7, p. 1481-1488, 2004.
- COSTA, M. D. M., *et al.* Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein. **Neuroscience Letters**, v. 461. n. 1, p. 16-20, 2009.
- D'SOUZA-SCHOREY, C.; CHAVRIER, P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7. n. 5, p. 347-358, 2006.
- DAMKE, H., *et al.* Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. **J Cell Biol**, v. 131. n. 1, p. 69-80, 1995.
- DAUMKE, O., *et al.* Architectural and mechanistic insights into an EHD ATPase involved in membrane remodelling. **Nature**, v. 449. n. 7164, p. 923-927, 2007.
- DAZZO, E., *et al.* Secretion-Positive LGI1 Mutations Linked to Lateral Temporal Epilepsy Impair Binding to ADAM22 and ADAM23 Receptors. **PLoS Genet**, v. 12. n. 10, p. e1006376, 2016.
- DE FRANCESCHI, N., *et al.* Integrin traffic - the update. **J Cell Sci**, v. 128. n. 5, p. 839-852, 2015.
- DENEKA, M., *et al.* Rabaptin-5/ α rabaptin-4 serves as a linker between rab4 and γ (1)-adaptin in membrane recycling from endosomes. **EMBO J**, v. 22. n. 11, p. 2645-2657, 2003.
- DHAUNCHAK, A. S., *et al.* A proteome map of axoglial specializations isolated and purified from human central nervous system. **Glia**, v. 58. n. 16, p. 1949-1960, 2010.
- DOEDENS, J. R.; BLACK, R. A. Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor- α converting enzyme. **J Biol Chem**, v. 275. n. 19, p. 14598-14607, 2000.
- DOHERTY, G. J.; MCMAHON, H. T. Mechanisms of endocytosis. **Annu Rev Biochem**, v. 78. p. 857-902, 2009.
- DUTTA, D., *et al.* Pitstop 2 is a potent inhibitor of clathrin-independent endocytosis. **PLoS One**, v. 7. n. 9, p. e45799, 2012.
- EHLERS, M. D. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. **Neuron**, v. 28. n. 2, p. 511-525, 2000.
- ELIZONDO, D. M., *et al.* Dendritic cell expression of ADAM23 governs T cell proliferation and cytokine production through the α (v) β (3) integrin receptor. **J Leukoc Biol**, v. 100. n. 5, p. 855-864, 2016.

- ENDRES, K., *et al.* Tumor necrosis factor- α converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. **European Journal of Biochemistry**, v. 270. n. 11, p. 2386-2393, 2003.
- EYSTER, C. A., *et al.* Discovery of new cargo proteins that enter cells through clathrin-independent endocytosis. **Traffic**, v. 10. n. 5, p. 590-599, 2009.
- FIVAZ, M., *et al.* Differential sorting and fate of endocytosed GPI-anchored proteins. **EMBO J**, v. 21. n. 15, p. 3989-4000, 2002.
- FRA, A. M., *et al.* A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. **FEBS Lett**, v. 375. n. 1-2, p. 11-14, 1995.
- FUKATA, Y., *et al.* Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. **Science**, v. 313. n. 5794, p. 1792-1795, 2006.
- FUKATA, Y., *et al.* Disruption of LGI1-linked synaptic complex causes abnormal synaptic transmission and epilepsy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107. n. 8, p. 3799-3804, 2010.
- FUKATA, Y., *et al.* The LGI1-ADAM22 protein complex in synaptic transmission and synaptic disorders. **Neurosci Res**, v. 116. p. 39-45, 2017.
- GABRIEL, L.; STEVENS, Z.; MELIKIAN, H. Measuring Plasma Membrane Protein Endocytic Rates by Reversible Biotinylation. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, v. n. 34, p. 1669, 2009.
- GHILARDI, C., *et al.* Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. **Bmc Genomics**, v. 9. 2008.
- GLEBOV, O. O.; BRIGHT, N. A.; NICHOLS, B. J. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. **Nat Cell Biol**, v. 8. n. 1, p. 46-54, 2006.
- GOLDSMITH, A. P.; GOSSAGE, S. J.; FFRENCH-CONSTANT, C. ADAM23 is a cell-surface glycoprotein expressed by central nervous system neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 78. n. 5, p. 647-658, 2004.
- GONG, Q., *et al.* Identification and characterization of a new class of trafficking motifs for controlling clathrin-independent internalization and recycling. **J Biol Chem**, v. 282. n. 17, p. 13087-13097, 2007.
- GRANT, B. D.; CAPLAN, S. Mechanisms of EHD/RME-1 protein function in endocytic transport. **Traffic**, v. 9. n. 12, p. 2043-2052, 2008.
- GRANT, B. D.; DONALDSON, J. G. Pathways and mechanisms of endocytic recycling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 10. n. 9, p. 597-608, 2009.
- GRUENBERG, J.; STENMARK, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5. n. 4, p. 317-323, 2004.
- GU, W.; BRODTKORB, E.; STEINLEIN, O. K. LGI1 is mutated in familial temporal lobe epilepsy characterized by aphasic seizures. **Ann Neurol**, v. 52. n. 3, p. 364-367, 2002.
- GUO, S., *et al.* Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1848. n. 10 Pt A, p. 2101-2110, 2015.
- HARMEY, J. H., *et al.* The cellular isoform of the prion protein, PrP^C, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 210. n. 3, p. 753-759, 1995.
- HAROLD, D., *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. **Nat Genet**, v. 41. n. 10, p. 1088-1093, 2009.

- HARRISON, R. E., *et al.* Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. **Mol Cell Biol**, v. 23. n. 18, p. 6494-6506, 2003.
- HIRAO, T., *et al.* Overexpression of ADAM9 enhances growth factor-mediated recycling of E-cadherin in human colon cancer cell line HT29 cells. **Exp Cell Res**, v. 312. n. 3, p. 331-339, 2006.
- HIVERT, B., *et al.* ADAM22 and ADAM23 modulate the targeting of the Kv1 channel-associated protein LGI1 to the axon initial segment. **J Cell Sci**, v. 132. n. 2, 2019.
- HOOPER, N. M. Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid precursor protein and prion protein. **Biochem Soc Trans**, v. 33. n. Pt 2, p. 335-338, 2005.
- HOOPER, N. M.; TAYLOR, D. R.; WATT, N. T. Mechanism of the metal-mediated endocytosis of the prion protein. **Biochem Soc Trans**, v. 36. n. Pt 6, p. 1272-1276, 2008.
- HSU, V. W.; PREKERIS, R. Transport at the recycling endosome. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22. n. 4, p. 528-534, 2010.
- HU, C., *et al.* The expression of ADAM23 and its correlation with promoter methylation in non-small-cell lung carcinoma. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 92. n. 5, p. 333-339, 2011.
- HUSSAIN, K. M., *et al.* The essential role of clathrin-mediated endocytosis in the infectious entry of human enterovirus 71. **J Biol Chem**, v. 286. n. 1, p. 309-321, 2011.
- KALACHIKOV, S., *et al.* Mutations in LGI1 cause autosomal-dominant partial epilepsy with auditory features. **Nat Genet**, v. 30. n. 3, p. 335-341, 2002.
- KANG, Y. S., *et al.* Clathrin-independent internalization of normal cellular prion protein in neuroblastoma cells is associated with the Arf6 pathway. **J Cell Sci**, v. 122. n. Pt 22, p. 4062-4069, 2009.
- KEGEL, L., *et al.* LGI proteins in the nervous system. **ASN Neuro**, v. 5. n. 3, p. 167-181, 2013.
- KEGEL, L., *et al.* Functional phylogenetic analysis of LGI proteins identifies an interaction motif crucial for myelination. **Development**, v. 141. n. 8, p. 1749, 2014.
- KESHET, G. I., *et al.* The Cellular Prion Protein Colocalizes with the Dystroglycan Complex in the Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 75. n. 5, p. 1889-1897, 2000.
- KIRKHAM, M.; PARTON, R. G. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1746. n. 3, p. 349-363, 2005.
- KOURANTI, I., *et al.* Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. **Curr Biol**, v. 16. n. 17, p. 1719-1725, 2006.
- KRATZSCHMAR, J.; LUM, L.; BLOBEL, C. P. Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. **J Biol Chem**, v. 271. n. 9, p. 4593-4596, 1996.
- KUMARI, S.; MAYOR, S. ARF1 is directly involved in dynamin-independent endocytosis. **Nat Cell Biol**, v. 10. n. 1, p. 30-41, 2008.
- LAFFONT-PROUST, I., *et al.* The N-terminal cleavage of cellular prion protein in the human brain. **FEBS Lett**, v. 579. n. 28, p. 6333-6337, 2005.
- LICHTENTHALER, S. F.; LEMBERG, M. K.; FLUHRER, R. Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments. **EMBO J**, v. 37. n. 15, 2018.
- LIMA, F. R., *et al.* Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem**, v. 103. n. 6, p. 2164-2176, 2007.

- LIN, J.; LUO, J.; REDIES, C. Differential expression of five members of the ADAM family in the developing chicken brain. **Neuroscience**, v. 157. n. 2, p. 360-375, 2008.
- LIU, H.; SHIM, A. H.; HE, X. Structural characterization of the ectodomain of a disintegrin and metalloproteinase-22 (ADAM22), a neural adhesion receptor instead of metalloproteinase: insights on ADAM function. **J Biol Chem**, v. 284. n. 42, p. 29077-29086, 2009.
- LIU, Z., *et al.* The ubiquitin-specific protease USP2a prevents endocytosis-mediated EGFR degradation. **Oncogene**, v. 32. n. 13, p. 1660-1669, 2013.
- LOPES, M. H., *et al.* Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neurogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci**, v. 25. n. 49, p. 11330-11339, 2005.
- LORENZEN, I., *et al.* Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. **Sci Rep**, v. 6. p. 35067, 2016.
- LOVERO, K. L., *et al.* The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112. n. 30, p. E4129-4137, 2015.
- LU, D., *et al.* ADAM-15 disintegrin-like domain structure and function. **Toxins (Basel)**, v. 2. n. 10, p. 2411-2427, 2010.
- LUM, L.; REID, M. S.; BLOBEL, C. P. Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. **J Biol Chem**, v. 273. n. 40, p. 26236-26247, 1998.
- MARELLA, M., *et al.* Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. **J Biol Chem**, v. 277. n. 28, p. 25457-25464, 2002.
- MARKUS, A., *et al.* Quantitative and dynamic expression profile of premature and active forms of the regional ADAM proteins during chicken brain development. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 16. n. 3, p. 431-451, 2011.
- MAXFIELD, F. R.; MCGRAW, T. E. Endocytic recycling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5. n. 2, p. 121-132, 2004.
- MAYOR, S.; PAGANO, R. E. Pathways of clathrin-independent endocytosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8. n. 8, p. 603-612, 2007.
- MCMAHON, H. T.; BOUCROT, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12. n. 8, p. 517-533, 2011.
- MITCHELL, K. J., *et al.* Functional analysis of secreted and transmembrane proteins critical to mouse development. **Nat Genet**, v. 28. n. 3, p. 241-249, 2001.
- MOK, S. C., *et al.* Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v. 52. n. 2, p. 247-252, 1994.
- MORANTE-REDOLAT, J. M., *et al.* Mutations in the LGI1/Epitempin gene on 10q24 cause autosomal dominant lateral temporal epilepsy. **Hum Mol Genet**, v. 11. n. 9, p. 1119-1128, 2002.
- MORGAN, M. R., *et al.* Giving off mixed signals--distinct functions of alpha5beta1 and alpha5beta3 integrins in regulating cell behaviour. **IUBMB Life**, v. 61. n. 7, p. 731-738, 2009.
- MYGIND, K. J., *et al.* Loss of ADAM9 expression impairs beta1 integrin endocytosis, focal adhesion formation and cancer cell migration. **J Cell Sci**, v. 131. n. 1, 2018.
- NASLAVSKY, N., *et al.* Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. **J Biol Chem**, v. 272. n. 10, p. 6324-6331, 1997.

- NASLAVSKY, N.; WEIGERT, R.; DONALDSON, J. G. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. **Mol Biol Cell**, v. 15. n. 8, p. 3542-3552, 2004.
- OHKAWA, T., *et al.* Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. **J Neurosci**, v. 33. n. 46, p. 18161-18174, 2013.
- OWUOR, K., *et al.* LGI1-associated epilepsy through altered ADAM23-dependent neuronal morphology. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 42. n. 4, p. 448-457, 2009.
- PARTON, R. G.; SIMONS, K. The multiple faces of caveolae. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8. n. 3, p. 185-194, 2007.
- PAUL, N. R.; JACQUEMET, G.; CASWELL, P. T. Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. **Curr Biol**, v. 25. n. 22, p. R1092-1105, 2015.
- PAULY, P. C.; HARRIS, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. **J Biol Chem**, v. 273. n. 50, p. 33107-33110, 1998.
- PAYNE, C. K., *et al.* Internalization and trafficking of cell surface proteoglycans and proteoglycan-binding ligands. **Traffic**, v. 8. n. 4, p. 389-401, 2007.
- PERERA, W. S.; HOOPER, N. M. Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. **Curr Biol**, v. 11. n. 7, p. 519-523, 2001.
- PETERS, P. J., *et al.* Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **J Cell Biol**, v. 162. n. 4, p. 703-717, 2003.
- PETERS, P. J., *et al.* Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. **Journal of Cell Biology**, v. 162. n. 4, p. 703-717, 2003.
- PIMPINELLI, F.; LEHMANN, S.; MARIDONNEAU-PARINI, I. The scrapie prion protein is present in flotillin-1-positive vesicles in central- but not peripheral-derived neuronal cell lines. **Eur J Neurosci**, v. 21. n. 8, p. 2063-2072, 2005.
- POWELKA, A. M., *et al.* Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. **Traffic**, v. 5. n. 1, p. 20-36, 2004.
- PRUSINER, S. B. Prions. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95. n. 23, p. 13363-13383, 1998.
- PUSCHEL, A. W.; ADAMS, R. H.; BETZ, H. Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. **Neuron**, v. 14. n. 5, p. 941-948, 1995.
- RACZ, B., *et al.* Lateral organization of endocytic machinery in dendritic spines. **Nat Neurosci**, v. 7. n. 9, p. 917-918, 2004.
- RADHAKRISHNA, H.; DONALDSON, J. G. ADP-ribosylation factor 6 regulates a novel plasma membrane recycling pathway. **J Cell Biol**, v. 139. n. 1, p. 49-61, 1997.
- RATCLIFFE, C. D., *et al.* Regulation of Cell Migration and beta1 Integrin Trafficking by the Endosomal Adaptor GGA3. **Traffic**, v. 17. n. 6, p. 670-688, 2016.
- ROBERTS, M., *et al.* PDGF-regulated rab4-dependent recycling of alphavbeta3 integrin from early endosomes is necessary for cell adhesion and spreading. **Curr Biol**, v. 11. n. 18, p. 1392-1402, 2001.
- RODAL, S. K., *et al.* Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10. n. 4, p. 961-974, 1999.
- SAGANE, K.; ISHIHAMA, Y.; SUGIMOTO, H. LGI1 and LGI4 bind to ADAM22, ADAM23 and ADAM11. **Int J Biol Sci**, v. 4. n. 6, p. 387-396, 2008.

- SAGANE, K., *et al.* Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem J**, v. 334 (Pt 1). p. 93-98, 1998.
- SAGANE, K., *et al.* Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene**, v. 236. n. 1, p. 79-86, 1999.
- SANDVIG, K., *et al.* Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. **Histochem Cell Biol**, v. 129. n. 3, p. 267-276, 2008.
- SANTUCCIONE, A., *et al.* Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. **J Cell Biol**, v. 169. n. 2, p. 341-354, 2005.
- SARNATARO, D., *et al.* PrP(C) association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. **Mol Biol Cell**, v. 15. n. 9, p. 4031-4042, 2004.
- SARNATARO, D., *et al.* Lipid rafts and clathrin cooperate in the internalization of PrP in epithelial FRT cells. **PLoS One**, v. 4. n. 6, p. e5829, 2009.
- SATO, M., *et al.* Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein. **EMBO J**, v. 27. n. 8, p. 1183-1196, 2008.
- SCARSELLI, M.; DONALDSON, J. G. Constitutive internalization of G protein-coupled receptors and G proteins via clathrin-independent endocytosis. **J Biol Chem**, v. 284. n. 6, p. 3577-3585, 2009.
- SCHAFER, B., *et al.* Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival. **J Biol Chem**, v. 279. n. 46, p. 47929-47938, 2004.
- SCHLOMANN, U., *et al.* The metalloprotease disintegrin ADAM8. Processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 277. n. 50, p. 48210-48219, 2002.
- SCHMID, E. M.; MCMAHON, H. T. Integrating molecular and network biology to decode endocytosis. **Nature**, v. 448. n. 7156, p. 883-888, 2007.
- SCHMITT-ULMS, G., *et al.* Time-controlled transcatheter perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. **Nat Biotechnol**, v. 22. n. 6, p. 724-731, 2004.
- SCHMITT-ULMS, G., *et al.* Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. **J Mol Biol**, v. 314. n. 5, p. 1209-1225, 2001.
- SCITA, G.; DI FIORE, P. P. The endocytic matrix. **Nature**, v. 463. n. 7280, p. 464-473, 2010.
- SEAGAR, M., *et al.* LGI1 tunes intrinsic excitability by regulating the density of axonal Kv1 channels. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114. n. 29, p. 7719-7724, 2017.
- SEALS, D. F.; COURTNEIDGE, S. A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev**, v. 17. n. 1, p. 7-30, 2003.
- SHI, A., *et al.* A novel requirement for *C. elegans* Alix/ALX-1 in RME-1-mediated membrane transport. **Curr Biol**, v. 17. n. 22, p. 1913-1924, 2007.
- SHYNG, S. L., *et al.* The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. **J Biol Chem**, v. 270. n. 24, p. 14793-14800, 1995.
- SLAGSVOLD, T., *et al.* Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. **Trends Cell Biol**, v. 16. n. 6, p. 317-326, 2006.
- SONNICHSEN, B., *et al.* Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. **J Cell Biol**, v. 149. n. 4, p. 901-914, 2000.

- STAUTZ, D., *et al.* Cell-surface Metalloprotease ADAM12 is Internalized by a Clathrin- and Grb2-dependent Mechanism. **Traffic**, v. 13. n. 11, p. 1532-1546, 2012.
- SUN, Y., *et al.* ADAM23 plays multiple roles in neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. **Neurochem Res**, v. 32. n. 7, p. 1217-1223, 2007.
- SUN, Y. P., *et al.* Two novel isoforms of Adam23 expressed in the developmental process of mouse and human brains. **Gene**, v. 325. p. 171-178, 2004.
- SUNYACH, C., *et al.* The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. **EMBO J**, v. 22. n. 14, p. 3591-3601, 2003.
- TAKADA, H., *et al.* ADAM23, a possible tumor suppressor gene, is frequently silenced in gastric cancers by homozygous deletion or aberrant promoter hypermethylation. **Oncogene**, v. 24. n. 54, p. 8051-8060, 2005.
- TARABOULOS, A., *et al.* Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. **J Cell Biol**, v. 129. n. 1, p. 121-132, 1995.
- TAYLOR, D. R.; HOOPER, N. M. The prion protein and lipid rafts. **Mol Membr Biol**, v. 23. n. 1, p. 89-99, 2006.
- TAYLOR, D. R.; HOOPER, N. M. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) mediates the endocytosis of the cellular prion protein. **Biochem J**, v. 402. n. 1, p. 17-23, 2007.
- TAYLOR, D. R., *et al.* Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. **J Cell Sci**, v. 118. n. Pt 21, p. 5141-5153, 2005.
- TONG, J. H., *et al.* Putative tumour-suppressor gene DAB2 is frequently down regulated by promoter hypermethylation in nasopharyngeal carcinoma. **BMC Cancer**, v. 10. p. 253, 2010.
- UNGEWICKELL, E. J.; HINRICHSSEN, L. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 19. n. 4, p. 417-425, 2007.
- VAN DER SLUIJS, P., *et al.* The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. **Cell**, v. 70. n. 5, p. 729-740, 1992.
- VERBISCK, N. V., *et al.* ADAM23 negatively modulates alpha(v)beta(3) integrin activation during metastasis. **Cancer Res**, v. 69. n. 13, p. 5546-5552, 2009.
- VEY, M., *et al.* Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93. n. 25, p. 14945-14949, 1996.
- VINCENT, B., *et al.* The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. **J Biol Chem**, v. 276. n. 41, p. 37743-37746, 2001.
- WALSENG, E.; BAKKE, O.; ROCHE, P. A. Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. **J Biol Chem**, v. 283. n. 21, p. 14717-14727, 2008.
- WANG, Z., *et al.* The mechanism of growth-inhibitory effect of DOC-2/DAB2 in prostate cancer. Characterization of a novel GTPase-activating protein associated with N-terminal domain of DOC-2/DAB2. **J Biol Chem**, v. 277. n. 15, p. 12622-12631, 2002.
- WATT, N. T.; GRIFFITHS, H. H.; HOOPER, N. M. Lipid rafts: linking prion protein to zinc transport and amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease. **Front Cell Dev Biol**, v. 2. p. 41, 2014.

- WESTERMANN, M.; STEINIGER, F.; RICHTER, W. Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its re-distribution after cholesterol depletion. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 123. n. 6, p. 613-620, 2005.
- WILSON, R., *et al.* Squalostatins alter the intracellular trafficking of a neurotoxic prion peptide. **BMC Neurosci**, v. 8. p. 99, 2007.
- WOLFSBERG, T. G., *et al.* ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. **J Cell Biol**, v. 131. n. 2, p. 275-278, 1995.
- WONG, E., *et al.* The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. **J Biol Chem**, v. 290. n. 19, p. 12135-12146, 2015.
- WOODMAN, P. G.; FUTTER, C. E. Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. **Curr Opin Cell Biol**, v. 20. n. 4, p. 408-414, 2008.
- WOODS, A. J., *et al.* PKD1/PKCmu promotes α 5 β 3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. **EMBO J**, v. 23. n. 13, p. 2531-2543, 2004.
- XU, S.; ZHU, J.; WU, Z. Loss of Dab2 expression in breast cancer cells impairs their ability to deplete TGF- β and induce Tregs development via TGF- β . **PLoS One**, v. 9. n. 3, p. e91709, 2014.
- YANCEY, P. G., *et al.* Cellular Cholesterol Efflux Mediated by Cyclodextrins: DEMONSTRATION OF KINETIC POOLS AND MECHANISM OF EFFLUX. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271. n. 27, p. 16026-16034, 1996.
- YANG, P.; BAKER, K. A.; HAGG, T. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. **Prog Neurobiol**, v. 79. n. 2, p. 73-94, 2006.
- YOKOI, N., *et al.* Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. **Nat Med**, v. 21. n. 1, p. 19-26, 2015.
- YUDOWSKI, G. A., *et al.* Cargo-mediated regulation of a rapid Rab4-dependent recycling pathway. **Mol Biol Cell**, v. 20. n. 11, p. 2774-2784, 2009.
- ZHU, G. Z.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P. Testase 1 (ADAM 24) a plasma membrane-anchored sperm protease implicated in sperm function during epididymal maturation or fertilization. **J Cell Sci**, v. 114. n. Pt 9, p. 1787-1794, 2001.
- ZIMMERMANN, P., *et al.* Syndecan recycling [corrected] is controlled by syntenin-PIP2 interaction and Arf6. **Dev Cell**, v. 9. n. 3, p. 377-388, 2005.

ANEXOS

Anexo 1 – Artigo de colaboração na área sobre ADAM23 publicado no periódico Neuroscience

NEUROSCIENCE
RESEARCH ARTICLE



Z. L. M. Borgonovo et al./Neuroscience 384 (2018) 165–177

Monoclonal Antibody DL11C8 Identifies ADAM23 as a Component of Lipid Raft Microdomains

Zaine L. M. Borgonovo,^{a,b,†} Caroline F. Ribeiro,^{a,†} Michele D. M. Costa,^{a,c,†} Ingrid L. M. Souza,^{a,b} Gustavo R. Rossi,^b Monica V. Alcantara,^a Max Ingberman,^a Luciano G. Braga,^a Adriana F. Mercadante,^a Lia S. Nakao^{a,b} and Silvio M. Zanata^{a,b,*}

^a Department of Basic Pathology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^b Department of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Department of Structural and Molecular Biology and Genetics, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brazil

Abstract—A disintegrin and metalloprotease protein 23 (ADAM23) is a transmembrane type I glycoprotein involved with the development and maintenance of the nervous system, including neurite outgrowth, neuronal adhesion and differentiation and regulation of synaptic transmission. In addition, ADAM23 seems to participate in immune response and tumor establishment through interaction with different members of integrin receptors. Here, we describe a novel monoclonal antibody (DL11C8) that specifically recognizes the cysteine-rich domain of both pre-protein (100 kDa) and mature (70 kDa) forms of ADAM23 from different species, including human, rodents and avian orthologs. Using this antibody, we detected both forms of ADAM23 on the cell surface of three neuronal cell lineages (Neuro-2a, SH-SY5Y and CHLA-20), with a higher relative content of ADAM23^{100 kDa}. Furthermore, we demonstrate for the first time that a catalytically inactive member of the ADAM family is present in the membrane signaling platforms, namely lipid rafts. Indeed, the mature ADAM23^{70 kDa} partitions between raft and non-raft membrane domains, while the pro-protein ADAM23^{100 kDa} is mainly expressed in non-raft domains. These membranous distributions were observed in both different brain regions homogenates and primary cultured neurons lysates from mouse cortex and cerebellum. Taken together, these findings point out ADAM23 as a lipid raft molecular component. © 2018 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: ADAM23, lipid rafts, disintegrins, monoclonal antibody, prion protein, integrin.

Anexo 2 – Artigo publicado na revista *Biomolecules* em colaboração com o grupo de pesquisa do Departamento de Genética-UFPR, 2020.



biomolecules



Article

Identification of miRNAs Enriched in Extracellular Vesicles Derived from Serum Samples of Breast Cancer Patients

Patricia M. M. Ozawa ¹ , Evelyn Vieira ¹, Débora S. Lemos ¹, Ingrid L. Melo Souza ² ,
Silvio M. Zanata ², Vânia C. Pankiewicz ³, Thalita R. Tuleski ³, Emanuel M. Souza ³,
Priscilla F. Wowk ⁴, Cícero de Andrade Urban ^{5,6}, Flavia Kuroda ⁶, Rubens S. Lima ⁶,
Rodrigo C. Almeida ^{1,7}, Daniela F. Gradia ¹ , Iglénir J. Cavalli ¹, Luciane R. Cavalli ^{8,9},
Danielle Malheiros ^{1,*} and Enilze M. S. F. Ribeiro ^{1,*}

- ¹ Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, Brazil; paty.mih@gmail.com (P.M.M.O.); evelynvieira1995@gmail.com (E.V.); deboraslemos@gmail.com (D.S.L.); rodrigocout@gmail.com (R.C.A.); danielagradia@gmail.com (D.F.G.); cavalli@ufpr.br (I.J.C.)
- ² Department of Cell and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, Brazil; ingridlms@yahoo.de (I.L.M.S.); smzanata@ufpr.br (S.M.Z.)
- ³ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, Brazil; vaniacarla@gmail.com (V.C.P.); thalituleski@hotmail.com (T.R.T.); souzaem@ufpr.br (E.M.S.)
- ⁴ Carlos Chagas Institute - Fiocruz-Paraná, Curitiba 81350-010, Brazil; priscilla@wowk.com.br
- ⁵ Positivo University Medical School, Curitiba 81280-330, Brazil; cicourban@hotmail.com
- ⁶ Nossa Senhora das Graças Hospital Breast Unit, Curitiba 80810-040, Brazil; flaviakuroda@hotmail.com (F.K.); rsilveiralima@uol.com.br (R.S.L.)
- ⁷ Department of Biomedical Data Sciences, Molecular Epidemiology, Leiden University Medical Center, 2300 R Leiden, The Netherlands
- ⁸ Department of Oncology, Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University, Washington, DC 20057, USA; lrc@georgetown.edu
- ⁹ Research Institute Pelé Pequeno Príncipe, Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba 80230-020, Brazil
- * Correspondence: mfdani@yahoo.com.br (D.M.); enilzeribeiro@gmail.com (E.M.S.F.R.); Tel.: +55-(41)-3361-1728 (E.M.S.F.R.)

Received: 5 December 2019; Accepted: 15 January 2020; Published: 16 January 2020



Abstract: MicroRNAs derived from extracellular vesicles (EV-miRNAs) are circulating miRNAs considered as potential new diagnostic markers for cancer that can be easily detected in liquid biopsies. In this study, we performed RNA sequencing analysis as a screening strategy to identify EV-miRNAs derived from serum of clinically well-annotated breast cancer (BC) patients from the south of Brazil. EVs from three groups of samples (healthy controls (CT), luminal A (LA), and triple-negative (TNBC)) were isolated from serum using a precipitation method and analyzed by RNA-seq (screening phase). Subsequently, four EV-miRNAs (miR-142-5p, miR-150-5p, miR-320a, and miR-443b-5p) were selected to be quantified by quantitative real-time PCR (RT-qPCR) in individual samples (test phase). A panel composed of miR-142-5p, miR-320a, and miR-443b-5p distinguished BC patients from CT with an area under the curve (AUC) of 0.8387 (93.33% sensitivity, 68.75% specificity). The combination of miR-142-5p and miR-320a distinguished LA patients from CT with an AUC of 0.9410 (100% sensitivity, 93.80% specificity). Interestingly, decreased expression of miR-142-5p and miR-150-5p were significantly associated with more advanced tumor grades (grade III), while the decreased expression of miR-142-5p and miR-320a was associated with a larger tumor size. These results provide insights into the potential application of EVs-miRNAs from serum as novel specific markers for early diagnosis of BC.

Keywords: extracellular vesicles; circulating microRNAs; RNA-seq; miRNA; liquid biopsy

Anexo 3 – Artigo de primeira autoria, submetido e encaminhado para revisores na revista Experimental Cell Research, 2020.

Elsevier Editorial System(tm) for
Experimental Cell Research
Manuscript Draft

Manuscript Number: ECR-20-419

Title: Endocytosis of the non-catalytic ADAM23: recycling and long half-life properties

Article Type: Full Length Article

Keywords: ADAM23; endocytosis; internalization; recycling endosome; early endosome; epilepsy

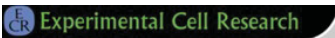
Corresponding Author: Professor Silvio M Zanata, Ph.D.


Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Paraná

First Author: Ingrid M Souza, MSc

Order of Authors: Ingrid M Souza, MSc; Natália H Oliveira, BSc; Pierina M Huamani, MSc; Zaine L Borgonovo, PhD; Lia S Nakao, PhD; Silvio M Zanata, Ph.D.

Abstract: ADAM23 (A Disintegrin And Metalloprotease 23) is a member of the ADAMs family of transmembrane proteins, mostly expressed in nervous system, and is involved in traffic and stabilization of Kv1-potassium channels, synaptic transmission, neurite outgrowth, neuronal morphology and cell adhesion. Also, ADAM23 has been linked with human pathological conditions, such as epilepsy, cancer metastasis and cardiomyopathy. ADAM23 functionality depends on the molecule presence at the cell surface and along the secretory pathway, as expected for a cell surface receptor. Because endocytosis is an important functional regulatory mechanism of plasma membrane receptors and no information is available about the traffic or turnover of non-catalytic ADAMs, we investigated ADAM23 internalization, recycling and half-life properties. Here, we show that ADAM23 undergoes constitutive internalization from the plasma membrane and is redistributed to intracellular vesicles, specially early and recycling endosomes. Furthermore, we observed that ADAM23 is recycled from intracellular compartments back to the plasma membrane and thus has a long half-life and cell surface stability. Our findings suggest that regulation of ADAM23 endocytosis/stability could be exploited therapeutically in diseases in which ADAM23 is directly involved, such as epilepsy, the progression of different cancers and cardiac hypertrophy.



[Contact us](#)  [Help](#)

[Impact of COVID-19 on peer review process: see here.](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: [ingridms@yahoo.de](#)
Switch To: Co-author | Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2020.2

Submissions Being Processed for Co-author Ingrid Larissa Melo de Souza

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	ECR-20-419	Endocytosis of the non-catalytic ADAM23: recycling and long half-life properties	Mar 12, 2020	Apr 04, 2020	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions)
Display 10 results per page.